

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ŞANLIURFA İLİ YONCA ALANLARINDA FİTOPLAZMA
ETMENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE SAPTANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE KONUKÇUSUNDA OLUŞTURDUĞU
BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER**

Hümeyra AYWACI

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2023**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
2.1. Türkiye’de Fitoplazmalarla İlgili Yapılan Çalışmalar;	9
2.2. Yonca Bitkisinde Fitoplazmalarla İlgili Çalışmalar;	10
2.3. Fitoplazma- Konukçu Etkileşimleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar;	14
2.4. Biyokimyasal Çalışmalar	17
2.5. Yonca-Fitoplazma Vektörü ile İlgili Yapılmış Çalışmalar;	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Materyaller	21
3.1.1. Araştırmanın gerçekleştiği yer ve kullanılan bitki materyalleri	21
3.1.2. PCR ve Sekans dizileme çalışmalarında kullanılan materyaller	21
3.1.2.1. PCR (Direkt-PCR ve Nested-PCR) ve Elektroforez Çalışması İçin Kullanılan Malzemeler;	21
3.1.2.1. Sekans analizleri sonrasında kullanılan program	22
3.1.3. Biyokimyasal analizlerde kullanılan ekipmanlar	22
3.1.4. İstatistik analiz için kullanılan program	22
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Bitki materyallerinin toplanması	22
3.2.2. DNA ekstraksiyonu	23
3.2.3. PCR Çalışmaları	24
3.2.4. Küsküt ile bulaşık olan bitkilerin tarladan toplanılması	27
3.2.5. Biyokimyasal analizler	27
3.2.5.1. Protein içeriğinin belirlenmesi	27
3.2.5.2. Klorofil içeriğinin belirlenmesi	28
3.2.5.3. Fenol içeriğinin belirlenmesi	29
3.2.5.4. Prolin içeriğinin belirlenmesi	29
3.2.5.5. Malondialdehit (MDA) içeriğinin belirlenmesi	30
3.2.5.6. Peroksidaz (E.C.1.11.1.7, POX) aktivitesinin belirlenmesi	31
3.2.5.7. Katalaz (E.C.1.11.1.6, CAT) aktivitesinin belirlenmesi	31
3.2.5.8. Jasmonik asit (JA) içeriğinin belirlenmesi	31
3.2.5.9. Salisilik asit (SA) içeriğinin belirlenmesi	32
3.2.6. İstatistik analiz	32
4. ARAŞTIRMA BULGULAR ve TARTIŞMA	33
4.1. Yonca Bitkisinde Belirlenen Simptomlar	33
4.2. Yonca Tarlalarında Bulunan Yabancı Otlar	35
4.3. Survey Değerlendirilmesi	38
4.4. Yabancı Otlarda Saptanan Fitoplazmalar	39
4.5. Moleküler Teknikler Kullanılarak Fitoplazmaların Tanınması	39
4.6. Filogenetik Analizleri	43
4.7. Küsküt Bitkilerinde Fitoplazmanın Teşhisi	46
4.8. Fitoplazma ile Bulaşık Yonca Bitkilerinde Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler	50
4.8.1. Klorofil içeriğinin belirlenmesi	50
4.8.2. Protein içeriğinin belirlenmesi	51
4.8.3. Fenol içeriğinin belirlenmesi	52

4.8.4. Prolin içeriğinin belirlenmesi	53
4.8.5. Lipit peroksidaz aktivitesinin (MDA) belirlenmesi	54
4.8.6. CAT (E.C.1.11.1.6, CAT) aktivitesinin belirlenmesi	55
4.8.7. POX (E.C.1.11.1.7, POX) aktivitesinin belirlenmesi	56
4.8.8. Jasmonik asit (JA)	56
4.8.9. Salisilik asit (SA).....	57
4.9. İstatiksel Analiz Sonuçları.....	58
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	63



ÖZET

Doktora Tezi

ŞANLIURFA İLİ YONCA ALANLARINDA FİTOPLAZMA ETMENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE SAPTANMASI, KARAKTERİZASYONU VE KONUKÇUSUNDA OLUŞTURDUĞU BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Hümeyra AYWACI

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Yıl: 2023, Sayfa: 79

Dünya da olduğu gibi Türkiye’de de en önemli yem bitkilerinden biri olan yonca bitkisinde son 8 yıl içerisinde fitoplazmaların neden olduğu semptomlara benzer (küçük yaprak, sararma, kızarıklık, bodurluk, cadı süpürgesi gibi) semptomlar gözlemlenmiştir. Bu çalışma 2018-2021 yılları arasında Şanlıurfa ilinde yonca yetiştiriciliği yapılan arazilerde küçük yaprak, sararma, kızarıklık, bodurluk ve cadı süpürgesi gibi semptomlar gösteren bitkiler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan bir dizi moleküler testler (DNA izolasyonu, DNA dizileme, Direkt-PCR ve Nested-PCR) sonucunda etmenin *Candidatus Phytoplasma australasia* (16SrII-D) ile %99.92 oranında ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca etmenin bitkinin fizyolojisinde meydana getirdiği biyokimyasal değişiklikler araştırılmıştır. Dokuz farklı parametre üzerinde yapılan araştırma sonucunda; infekteli bitkilerin sağlıklı bitkilere kıyasla klorofil ve protein içeriklerinin oldukça düşük olduğu, ancak Fenol, Prolin, MDA (lipit peroksidaz aktivitesi), CAT (katalaz aktivitesi), POX (peroksidaz aktivitesi) ve JA (jasmonik asit) içeriklerinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir ($P \leq 0.05$). Infekteli bitkilerin sağlıklı bitkilere kıyasla SA (salisilik asit) içeriğinin ise yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P \leq 0.05$). Diğer yandan etmenin sağlıklı bitkilere taşınma yolları ve yabancı ot konukçuları araştırılmıştır. Sonuç olarak; *Sonchus asper* (Dikenli eşek marulu) %98.7, *Convolvulus arvensis* (Tarla sarmaşığı) %98.7, *Cuscuta* spp. (Küsküt) %98.7, *Lolium perenne* (İngiliz çimi) %98.7 ve *Orobanche* spp. (Canavar otu) %98.6 oranında *Ca. P. australasia* ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Fitoplazma, *Candidatus Phytoplasma australasia* (16SrII-D), biyokimyasal değişiklikler, yabancı ot, moleküler testler

ABSTRACT

Ph.D Thesis

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF PHYTOPLASMA AGENTS IN LUCERNE GROWING AREAS BY MOLECULAR METHODS IN SANLIURFA PROVINCE AND BIOCHEMICAL CHANGES IN THE HOST

Hümeyra AYVACI

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR

Year: 2023, Page: 79

Symptoms similar to those caused by phytoplasma (such as small leaves, yellowing, reddening, stunting, witches' broom) have been observed in lucerne, one of the most important forage crops both in Turkey and worldwide, during the last 8 years. This study was conducted on plants showing symptoms of small leaves, yellowing, reddening, stunting, and witches' broom in lucerne fields in Şanlıurfa province between 2018 and 2021. As a result of a series of molecular tests (DNA isolation, DNA sequence, Direct-PCR and Nested-PCR), the factor was found to be 99.92% related to *Candidatus* Phytoplasma australasia (16SrII-D). In addition, the biochemical changes caused by the agent in the plant physiology were investigated. As a result of the research conducted on nine different parameters; it was determined that the chlorophyll and protein contents of infected plants were quite low compared to healthy plants, but the Phenol, Proline, MDA (lipid peroxidase activity), CAT (catalase activity), POX (peroxidase activity) and JA (jasmonic acid) contents were quite high ($P \leq 0.05$). It was determined that the SA (salicylic acid) content of infected plants was higher compared to healthy plants, but there was no statistically significant difference ($P \leq 0.05$). On the other hand, the ways of transfer of the agent to healthy plants and weed hosts were investigated. In conclusion; *Sonchus asper* (Prickly donkey lettuce) 98.7%, *Convolvulus arvensis* (Field creeper) 98.7%, *Cuscuta* spp. (Dodder) 98.7%, *Lolium perenne* (English grass) 98.7% and *Orobancha* (Monster grass) 98.6% were associated with *Ca.P.australasia*.

KEYWORDS: Phytoplasma, *Candidatus* Phytoplasma australasia (16SrII-D), biochemical changes, weed, molecular tests

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim boyunca hem akademik hem de sosyal alanlarda her zaman bana destek veren, bilgi ve tecrübelerini biz öğrencilerinden esirgemeyen, alanımızda bizlere yeni bakış açıları kazandıran ve yenilikleri takip edebilme yeteneğini aşıl原因 değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul Güldür'e saygılarımı ve teşekkürlerimi içtenlikle sunarım.

Bu süreç boyunca geniş bilgi ve deneyimlerini bizlere sunan ve bu yolda bana değerli vaktini birçok kez ayıran değerli hocam Doç. Dr. Murat Dikilitaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen sayın hocamlarım Doç. Dr. Sema Karakaş Dikilitaş ve Arş. Gör. Eray Şimşek'e sonsuz teşekkürler. Laboratuvar ve arazi çalışmalarımında yardımlarını esirgemeyen Dr. Havva Akkurak, Zir. Yük. Müh. Nesibe Kılıç, Zir. Yük. Müh. Ayşe Hümevra Koçakoğlu, Zir. Yük. Müh. Sıdıka Durmuş ve Zir. Yük. Müh. Süleyman Çakmak sonsuz teşekkürler. Ayrıca tez çalışmamın istatistik analizlerinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli Zir. Yük. Müh. Yılmaz Göksu'ya sonsuz teşekkürler.

Yüksek Öğretim Kurumu tarafından YÖK 100/2000 projesi kapsamında "Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji (Tohum Araştırmaları ve Aşı Teknolojisi dahil)" öncelikli alan kapsamında desteklenen bu tez için YÖK'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman beni destekleyen ve ellerindeki tüm imkanları hayallerimi gerçekleştirmem için sunan canım annem Fatma Ayvacı, canım babam Ali İhsan Ayvacı, canım kardeşlerim Ahmet & Neslihan Ayvacı ve canım babaannem Refika Ayvacı'ya sonsuz teşekkürler. Maddi ve manevi her daim benim yanımda olan ve beni bu süreçte motive eden değerli kız kardeşlerim Neziha Gamze Akbay, Derya Oğan ve Fatma Akbay'a sonsuz teşekkürler.

Bu tezi, yürüttüğüm süreç boyunca hem dünyada hem de Türkiye'de meydana gelen felaketlerde hayatlarını kaybeden arkadaşlarım, dostlarım ve onların değerli ailelerine ithaf ediyorum. Sonsuza kadar saygı ve sevgiyle...

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Şanlıurfa ili Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde yer alan yonca tarlalarından yonca ve yabancı ot örnek toplanmıştır.	23
Şekil 3.2. PCR işleminde bir tüp içerisinde bulunması gereken materyaller; DNA materyali, taq polimeraz, dNTP, primer çifti, mix buffer ve ddH ₂ O. Çalışmada kullanılan thermocycle cihazı (Thermo)	25
Şekil 3.3. Direkt ve nested PCR çalışmalarında uygulanan thermocycle koşulları.	26
Şekil 3.4. Protein içeriğinin belirlenmesi için Bovine Serum Albumin Fraction V (Sigma) kullanılarak hazırlanan standart eğrisi.	28
Şekil 3.5. Prolin içeriğinin belirlenmesi için kullanılan L-prolin standart eğrisi.	30
Şekil 4.1. Survey yapılan bir yonca tarlası	33
Şekil 4.2. Yonca bitkilerinde a) küçük yaprak oluşumu-sararma ve sağlıklı bitki; b) bodurluk ve sağlıklı bitki.	34
Şekil 4.3. Yonca bitkilerinde a-b) küçük yaprak oluşumu ve sararma ve c-d) yapraklarda sararma	34
Şekil 4.4. Yonca bitkilerinde görülen a) kızarıklık; b) sararma; c) bodurluk ve d) cadısüpürgesi.	35
Şekil 4.5. Yonca tarlalarından toplanan yabancı otlar a) <i>Isatis tinctorio</i> b) <i>Orobanch</i> spp. c) <i>Capsella bursa-pastoris</i> d) <i>Hordeum murinum</i> e) <i>Lolium perenne</i> f) <i>Cirsium arvense</i> ve g) <i>Sonchus asper</i>	37
Şekil 4.6. Yonca tarlalarında a) <i>Malva sylvestris</i> b) <i>Orobanch</i> spp. ve c) <i>Convolvulus arvensis</i>	38
Şekil 4.7. Direk-PCR ve nested-PCR sonrasında yonca bitkilerinin jel elektroforez görüntüleri: 1. kuyucukta marker, 2-6. kuyucuklarda Ceylanpınar'dan alınan infekteli yonca bitkileri, 7-9. kuyucuklarda Siverek'ten alınan infekteli yonca bitkileri, 10-12. kuyucuklarda Suruç'tan alınan infekteli yonca bitkileri, 13. kuyucukta sağlıklı yonca bitkisi (simptomsuz), 14. pozitif kontrol (fitoplazma tanılanması için spesifik olan 1.400 bp ve 1250 bp üreten kaktüs) ve 15. negatif kontrol (ddH ₂ O) (%1 agaroz jel)	40
Şekil 4.8. Direk-PCR ve nested-PCR sonrasında yabancı otların jel elektroforez görüntüleri: 1. kuyucukta marker, 2. kuyucukta <i>Orobanch</i> , 3. kuyucukta <i>Lolium perenne</i> , 4. kuyucukta <i>Sonchus asper</i> , 5. kuyucukta <i>Convolvulus arvensis</i> 6. <i>Cuscuta</i> , 7. pozitif kontrol (fitoplazma tanılanması için spesifik olan 1.400 bp ve 1250 bp üreten kaktüs) ve 8. sağlıklı yonca bitkisi (simptomsuz) (%1 agaroz jel)	41
Şekil 4.9. Ceylanpınar, Siverek, Suruç ilçeleri yonca tarlalarından alınan ve infekteli oldu belirlenen bitkilerin <i>iPhyClassifier</i> programı kullanılarak in silico jel görüntüleri elde edilmiştir. a) Ceylanpınar; b) Siverek, c) Suruç ve d) <i>Ca. P. australasia</i> (sınıflandırmada kullanılan kayıtlı izolat).	42
Şekil 4.10. Ceylanpınar, Siverek, Suruç ilçeleri yonca tarlalarından toplanan yabancı otlardan bulaşık oldu belirlenen bitkilerin <i>iPhyClassifier</i> programı kullanılarak in silico jel görüntüleri elde edilmiştir. a) küsküt; b) tarla sarmaşığı; c) canavarotu; d) İngiliz çimi; e) dikenli eşek marulu ve f) <i>Ca. P. australasia</i> (sınıflandırmada kullanılan kayıtlı izolat).	43
Şekil 4.11. Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde pozitif olduğu belirlenen yonca bitkileri 49 gruplar/alt grupları ile karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaç.	45
Şekil 4.12. Yonca tarlalarından toplanan ve pozitif olduğu belirlenen yabancı otların 49 gruplar/alt grupları ile karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaç.	46
Şekil 4.13. Tarlada yonca-tarla sarmaşığı arasında kurulan küsküt köprüsü.	47

Şekil 4.14. Ceylanpınar ilçesi yonca tarlasında bulunan yonca-tarla sarmaşığı-küsküt bitkilerinin fitoplazma ile bulaşık oldu belirlenmiş ve <i>iPhyClassifier</i> programı kullanılarak elde edilen sekans dizileri üzerinden <i>in silico</i> jel görüntüleri elde edilmiştir. a) küsküt; b) tarla sarmaşığı; c) yonca ve d) <i>Ca. P. australasia</i> (sınıflandırmada kullanılan kayıtlı izolat).	49
Şekil 4.15. Yonca, tarla sarmaşığı ve küsküt bitkilerinde mevcut bulunan fitoplazma etmeninin hem aralarında hemde 49 gruplar/alt grupları ile karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaç.	50
Şekil 4.16. Sağlıklı ve infekteli bitkilerin klorofil (toplam, a ve b) içerikleri.	51
Şekil 4.17. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde protein içeriği.....	52
Şekil 4.18. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde fenol içeriği.....	53
Şekil 4.19. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde prolin içeriği.....	54
Şekil 4.20. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde MDA içeriği.....	54
Şekil 4.21. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde CAT içeriği.....	55
Şekil 4.22. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde POX içeriği.....	56
Şekil 4.23. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde JA içeriği.....	57
Şekil 4.24. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde SA içeriği.....	58
Şekil 4.25. Enfekte olmuş bitkide ölçülen biyokimyasal parametreler (toplam klorofil, prolin, protein, MDA, CAT, Pox, JA, SA ve fenol) arasındaki kolerasyon ilişkisi ($P \leq 0.05$ 'e dayalı LSD testi).	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Türkiye’de yonca üretiminin yıllara göre yetiştiriciliği yapılan alan ve verim miktarları	1
Çizelge 1.2. Fitoplazma sınıflandırılmasında kullanılan 16Sr grup/altgruplar	5
Çizelge 3.1. Direkt ve nested-PCR işlemlerinde kullanılan primer çiftlerinin baz dizilimleri ..	25
Çizelge 4.1. İlçelerde yer alan yonca tarlalarından toplanan yabancı ot türleri ve sayıları	36
Çizelge 4.2. Ceylanpınar, Siverek, Suruç ilçelerinden toplanan yonca ve yabancı otların fitoplazma ile bulaşıklık durumu	39



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µl	Mikro Litre
µM	Mikro Molar
bp	Baz Çifti
<i>Ca.</i>	<i>Candidatus</i>
CAT	Katalaz
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide
dNTP	DNA Nükleotit Bazları
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
ETBR	Etidyum Bromür
<i>iPhyClassifier</i>	Çeşitli Fitoplazmaların Uluslar Arası Sınıflandırma Yazılım Programı
IRPCM	The International Organization for Mycoplasmaology
JA	Jasmonik Asit
JAs	Jasmonik Asit Türevleri
Kb	kilobase base
MDA	Malondialdehit
MEGAX	DNA Dizileme Yazılım Programı
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Millilitre
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POX	Peroksidaz
PPO	Polifenoloksidaz
PVP	Polyvinylpyrrolidone
rDNA	ribozomal DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rRNA	ribozomal RNA
rpm	Revolutions per Minute
SA	Salisilik Asit
SOD	Süper Oksit Dismutaz
TAE	Tris-acetate Etilendiamin Tetraasetikasit
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBA	Thiobarbituric Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
16SrDNA	16 Svedberg Ribosomal Ribonükleik Asit
°C	Santigrat derece
ΔA	Delta Absorbans

1.GİRİŞ

En eski yem kaynağı olarak bilinen yonca (*Medicago sativa*) bitkisi, dünya çapında 80 milyon dekar üzerinde yetiştirilen, “yemlerin kraliçesi” olarak adlandırılan ve nitrojen sabitleyici özellikleri sayesinde tarım tarihinde yıllardır üretilen baklagil yem bitkilerinden biridir (Russelle, 2001). Uygarlıkların gelişmesi ve hayvanların çiftlikler altında beslenmesi ile yonca bitkisinin birçok özelliği fark edilmiştir. Özellikle yoncanın mükemmel hayvan yemi sağladığı, toprağı iyileştirdiği, diğer mahsullerin verimliliğini artırdığını ve bunların dışında ilaç yapımında kullanılabileceği belirlenmiştir. Tarihsel sürece bakıldığında dünya genelinde yonca üretiminin 1980’li yıllarda yaklaşık 32 milyon hektar üretim alanına sahip olduğu bilinmektedir (Michaud ve ark., 1988). Günümüze yaklaştıkça ise 35 milyon hektar alanda 255 milyon ton yonca yetiştiriciliğinin yapıldığı bilinmektedir (Karadaş ve ark., 2019). Yonca, baklagiller familyasına ait olan ve ülkemizde en fazla yetiştiriciliği yapılan yem bitkilerinden biridir. Özellikle de son yıllarda yem bitkilerinin yetiştiriciliğine devlet desteğinin gelmesi hem ekim alanlarında hem de verimde ciddi oranlarda artışların gerçekleşmesine neden olmuştur (Acar ve ark., 2020). Ülkemizde tarım yapılan toplam arazi miktarının 238 639 481.1 dekar olduğu, bunun ise 6 470 151 dekarında yonca yetiştiriciliği yapıldığı bilinmektedir (Tüik, 2022).

Çizelge 1.1. Türkiye’de yonca üretiminin yıllara göre yetiştiriciliği yapılan alan ve verim miktarları

	Ekim alanı (Yeşil ot) (da)	Hasat edilen alan (Yeşil ot) (da)	Üretim miktarı (Yeşil ot) (ton)	Ekim alanı (Tohum) (da)	Hasat edilen alan (Tohum) (da)	Üretim miktarı (Tohum) (ton)
2017	6 594 319	6 566 119	17 561 190	15 848	15 848	922
2018	6 351 052	6 332 567	17 544 946	18 488	18 488	1 204
2019	6 412 128	6 379 330	17 949 264	30 025	30 025	1 513
2020	6 628 887	6 600 147	19 290 519	28 850	28 850	1 695
2021	6 730 474	6 669 741	19 310 959	31 432	31 432	1 861
2022	6 435 927	6 411 294	19 064 213	34 224	34 224	2 049

Güneydoğu Anadolu bölgesinde toplam yonca ekim alanı 118 247 dekar olup bunun 44 583 dekarı (%37.70) Şanlıurfa ilinde yer almaktadır. Ülke genelinde yonca tohum üretim alanlarının %35’lik kısmı ise yine Şanlıurfa ilinde bulunmaktadır (TÜİK, 2022).

Yonca bitkisi, her türlü çevre koşulunda yetişebilen ve yüksek besin değeri sayesinde hayvan beslenmesinde (yaş ot, kuru ot ve silaj) oldukça tercih edilen çok yıllık bir mera bitkisidir. Yem bitkisi olarak tercih edilmesinin nedenleri sırasıyla; hayvansal üretimde verimliliği artırması, yüksek sindirilebilir özelliği, rumen florası için gerekli vitamin ve mineral içeriğine sahip olması, kuru madde alımını sağlaması ve üreme gücüne olan olumlu etkileridir (Kır ve Soya, 2008). Geleneksel yetiştiricilikte mono kültür olarak ekilmektedir. Ayrıca yonca bitkisi, köklerinde yer alan rizobiler ile simbiyotik ilişkiler kurarak atmosferdeki nitrojeni amonyaka dönüştürür. Bu amonyak bitkiye glutamin ve üre gibi organik birleşikler sağlar. Diğer yandan, çoğu mera türünden farklı olarak oluşturdukları kazık kökleri sayesinde toprak içerisinde daha derinlere inerek su ihtiyaçlarını karşılarlar ve bu sayesinde su eksikliği çeken bölgelerde kolaylıkla yetiştirebilirler (Brown, 2004). Yonca standının ortalama ömrünün 7-9 yıl olduğu ancak Langer (1973) tarafından yapılan bir araştırmada ise bir yonca standının uygun çevre koşulları altında 20 yıla kadar yaşayabileceği belirtilmiştir.

Son yıllarda azotlu gübrelerin yoğun olarak kullanılmasına rağmen yonca tarımı yine de hayati bir rol üstlenir. Yonca bitkisinin yeni kullanım alanlarının geliştirilmesi sayesinde gelecek yıllar içerisinde daha duyarlı yaklaşımların ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (Russelle, 2001).

Yem bitkilerinin başarılı bir şekilde yetiştirilmesi hayvansal üretimin koruyucusu olarak nitelendirilir. Bu nedenle hayvansal üretim için yetiştirilen yem bitkilerinin üretimindeki gereksinimlerin iyi belirlenmesi, ayrıca elde edilecek çıktılarda yüksek kalite ve verim talebini dengelemesi/karşılması gerekmektedir (Moot ve ark., 2003). Yonca yetiştiriciliğinde ilk adım hiç şüphesiz çevre koşullarının belirlenmesidir. Ancak çevre koşullarının dışında yem kalitesini etkileyen hastalıklar, zararlılar ve yetiştiricilik esnasında tarlada mevcut bulunan yabancı otların etkilerinin de iyi bilinmesi ve gerekli önlemlerin yetiştiriciliğin ilk başından itibaren dikkatlice planlanması gerekmektedir.

Yonca üretiminde kaliteyi ve verim miktarını azaltan birçok abiyotik ve biyotik stres faktörleri vardır. Çevresel koşulların verim üzerine etkileri hiç şüphesiz göz ardı edilmeyecek kadar fazladır. Ancak hastalık ve zararlıların etkilerinin gün geçtikçe çevre koşulları ile ikili stres oluşturarak daha hızlı ve yıkıcı oldukları görülmektedir. Yonca bitkisinde mevcut olan biyotik stres faktörlerinden en önemlileri sırasıyla, zararlılar; yonca hortumlu böceği [*Hypera variabilis* Herbst., *Hypera postica* (Gyllenhal), *Phytonomus postica* (Coleoptera: Curculionidae)]. Yoncada mevcut bulunan fungal hastalıklar, *Peronospora trifolium*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Stemphylium botryosum*, *Phoma medicaginis*, *Leveillula taurica*, *Colletotrichum* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mocrophomina phaseolina*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*'dir. Yoncada bulunan viral etmen ise; Yonca mozaik virüsü (*Alfalfa Mosaic Alfamovirus-AMV*). Yoncada bulunan yabancı otlar ise; Küsküt (*Cuscuta campestris*), Yabani hardal (*Sinapis arvensis*), Yabani turp (*Raphanus raphanistrum*), Çoban çantası (*Capsella bursa-pastoris*), Sarı ot (*Boreava orientalis*), Eşek dikenini (*Onopordium* spp.), Kangal (*Carduus* spp.), Tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*), Köy göçüren (*Cirsium arvense*), Çayır otu (*Bromus* spp.)'dur. Bu zararlı ve hastalık etmenlerinin dışında son yıllarda birçok farklı bitki türünde hastalığa neden olan ve zaman geçtikçe etkisi daha şiddetli hale gelen fitoplazma hastalığı da yonca bitkisinde görülmeye başlamıştır. Özellikle hastalıklı bitkilerde şiddetli belirtilerin görülmesi ve her geçen yıl bulaşıklığın daha fazla olması bu etmeni yonca bitkisi için önemli verim kayıplarına neden olan hastalıklardan biri haline getirmiştir. Fitoplazma etmeni gün geçtikçe daha şiddetli hale gelmektedir. Özellikle küresel ısınmanın etkisiyle fitoplazma etmeninin daha hızlı bir şekilde çoğalma ve yayılım gerçekleştirdiği bilinmektedir (Galletto ve ark., 2011).

Prokaryot özelliği taşıyan fitoplazmalar hem bitki hem de böcekler içinde yaşayabilen patojenik bakterilerden biridir (IRPCM, 2004). Mollicutes sınıfına ait olan bu etmen, dünya genelinde farklı özelliklere sahip birçok bölgede ve farklı bitki dizilerinde hastalığa neden olabilmektedir. Genellikle Hemiptera takımında yer alan bitki öz suyu ile beslenen böcekler vasıtasıyla konukçu bitkiler arasında taşınır. Ayrıca

küsküt ve tohumla taşınmaları konusunda birçok çalışma yürütülmüştür. Genel olarak bu patojen konukçuların yapraklarında; sararma, küçülme, kloroz ve phyllody, çiçeklerinde; virescence (çiçek yeşillenmesi) ve bitkinin genelinde ise; bodurluk ve cadisüpürgesi (witches' broom) gibi simptomlara neden olmaktadır. Hastalık dünyada ilk olarak 1600 yıllarında başında rapor edilmiş ve bunu takip eden yıllarda dünya genelinde birçok farklı bölgede ve farklı bitkide varlığı rapor edilmiştir (Okuda,1972; Hogenhout ve ark., 2008). Hastalık önceleri virüs benzeri belirtiler oluşturduğu ve kültüre alınamadığından dolayı virüs olarak nitelendirilmiş, ancak Doi ve arkadaşlarının 1967 yılında yürütmüş oldukları bir çalışmada farklı fitoplazmalar ile bulaşık bitkilerin floemlerinde insan ve hayvan mikoplazmalarına benzeyen yapılar bulmuş ve bu yapının hücre duvarının olmadığı ve mikoplazma benzeri büyüklükte (80-800 nm) plemorfik yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonrasında 1994 yılına gelindiğinde etmen üzerine yapılan araştırmalar göz önüne alınarak Fitoplazma Çalışma Grubu Uluslararası Mikoplazmoloji Organizasyon (The International Organization for Mycoplasmaology=IRPCM)'nunda etmenin adının "Fitoplazma" olarak isimlendirilmesi kabul etmiştir. Ardından 2004 yılında IRPCM (The International Organization for Mycoplasmaology) tarafından "*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*" olarak yeni bir cins içerisinde yer alması önerilmiştir (IRPCM, 2004).

Bu etmenin tanılanmasında moleküler belirteçler kullanılmaktadır. Fitoplazmaların moleküler sekans çalışmaları, oluşan gruplar ve alt grupların genetik olarak farklı ve tutarlı zengin bir takson oluşturmasına neden olmuştur (Lee ve ark., 1998). Genetik türler için hazırlanan bu takson temelde 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılmasına dayanır. Günümüze gelindiğinde fitoplazmaların ribozomal 16S rRNA genine dayalı 33 grup altında toplandığını ve toplamda alt gruplar dahilinde 49 farklı türü bulunduğu bildirilmiştir (Bertaccini ve ark, 2022).

Çizelge 1.2. Fitoplazma sınıflandırılmasında kullanılan 16Sr grup/altgruplar.

'Ca. Phytoplasma' türleri	GenBank numarası	Kaynak
'Ca. P. allocasuarinae'- (16SrXXXIII-A)	AY135523	(Marccone ve ark., 2004a)
'Ca. P. americanum'- (16SrXVIII-A)	DQ174122	(Lee ve ark., 2006)
'Ca. P. asteris'- (16Srl-B)	M30790	(Lee ve ark., 2004a)
'Ca. P. aurantifolia'- (16SrlI-B)	U15442	(Zreik ve ark., 1995)
'Ca. P. australasia'- (16SrlI-D)	Y10097	(White ve ark., 1998)
'Ca. P. australiense'- (16SrXII-B)	L76865	(Davis ve ark., 1997)
'Ca. P. balanitae'- (16SrV-F)	AB689678	(Win ve ark., 2013)
'Ca. P. brasiliense'- (16SrXV-A)	AF147708	(Montano ve ark., 2001)
'Ca. P. caricae'- (16SrXVII-A)	AY725234	(Arocha ve ark., 2005)
'Ca. P. castaneae'- (16SrXIX-A)	AB054986	(Jung ve ark., 2002)
'Ca. P. cirsii'- (16SrXI-E)	KR869146	(Šafářová ve ark., 2016)
'Ca. P. cocostanzaniae'	X80117	(Tymon ve ark., 1998)
'Ca. P. convolvuli'- (16SrXII-H)	JN833705	(Martini ve ark., 2012)
'Ca. P. costaricanum'- (16SrXXXI-A)	HQ225630	(Lee ve ark., 2011)
'Ca. P. cynodontis'- (16SrXIV-A)	AJ550984	(Marccone ve ark., 2004b)
'Ca. P. dypsidiis'	MT293886	(Jones ve ark., 2021)
'Ca. P. fragariae'- (16SrXII-E)	DQ086423	(Valiunas ve ark., 2006)
'Ca. P. fraxini'- (16SrVII-A)	AF092209	(Griffiths ve ark., 1999)
'Ca. P. graminis'- (16SrXVI-A)	AY725228	(Arocha ve ark., 2005)
'Ca. P. hispanicum'- (16SrXIII-A)	AF248960	(Davis ve ark., 2016)
'Ca. P. japonicum'- (16SrXII-D)	AB010425	(Sawayanagi ve ark., 1999)
'Ca. P. luffae'- (16SrVIII-A)	AF248956	(Davis ve ark., 2017)
'Ca. P. lycopersici'- (16Srl-Y)	EF199549	(Arocha ve ark., 2007)
'Ca. P. malaysianum'- (16SrXXXII-A)	EU371934	(Nejat ve ark., 2013)
'Ca. P. mali'- (16SrX-A)	AJ542541	(Seemüller ve Schneider, 2004)
'Ca. P. meliae'- (16SrXIII-G)	KU850940	(Fernández ve ark., 2016)
'Ca. P. noviguineense'	LC228755	(Miyazaki ve ark., 2018)
'Ca. P. omanense'- (16SrXXIX-A)	EF666051	(Al-Saady ve ark., 2008)
'Ca. P. oryzae'- (16SrXI-A)	D12581	(Jung ve ark., 2003b)
'Ca. P. palmae'- (16SrlV)	U18747	(Harrison ve ark., 2007)
'Ca. P. palmicola'- (16SrXXII-A)	KF751387	(Harrison ve ark., 2014)
'Ca. P. phoenicium'- (16SrlX-B)	AF515636	(Verdin ve ark., 2003)
'Ca. P. pini'- (16SrXXI-A)	AJ632155	(Schneider ve ark., 2005)
'Ca. P. pruni'- (16SrlII-A)	JQ044392	(Davis ve ark., 2013)
'Ca. P. prunorum'- (16SrX-B)	AJ542544	(Seemüller ve Schneider, 2004)
'Ca. P. pyri'- (16SrX-C)	AJ542543	(Seemüller ve Schneider, 2004)
'Ca. P. rhamni'- (16SrXX-A)	X76431	(Marccone ve ark., 2004a)
'Ca. P. rubi'- (16SrV-E)	AY197648	(Malembic-Maher ve ark., 2011)
'Ca. P. sacchari'	VWXM00000000	(Kirdat ve ark., 2020)
'Ca. P. solani'- (16SrXII-A)	AF248959	(Quaglino ve ark., 2013)
'Ca. P. spartii'- (16SrX-D)	X92869	(Marccone ve ark., 2004a)
'Ca. P. stylosanthis'- (16SrXXXVII-A)	MT431550	(Jardim ve ark., 2021)
'Ca. P. sudamericanum'- (16SrVI-I)	GU292081	(Davis ve ark., 2012)
'Ca. P. tamaricis'- (16SrXXX-A)	FJ432664	(Zhao ve ark., 2009a)
'Ca. P. trifolii'- (16SrVI-A)	AY390261	(Hiruki ve Wang, 2004)
'Ca. P. tritici'- (16Srl-C)	DQ078304	(Wu ve ark., 2009)
'Ca. P. ulmi'- (16SrV-A)	AY197655	(Lee ve ark., 2004b)
'Ca. P. woydetiae'- (16SrXXXVI-A)	KC844879	(Naderali ve ark., 2017)
'Ca. P. ziziphi'- (16Srv-B)	AB052876	(Jung ve ark., 2003a)

Fitoplazmaların sınıflandırılmasında, türler arasında evrimsel ilişkilerin belirlenmesinde ve taksonomisinin oluşturulmasında *16S rRNA* geninden yararlanılmaktadır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda 16S rRNA geninin biyoçeşitlilik açısından alt grupların sınıflandırılmasında yeterli olmadığı belirlenmiştir (Zhao ve ark., 2009b). Bu eksiliğin giderilmesi için 17 tane restriksiyon enziminin (*BamHI*, *AluI*, *BfaI*, *DraI*, *BstUI* (*ThaI*), *HhaI*, *HinfI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HpaI*, *HpaII*, *MseI*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *RsaI*, *TaqI* ve *SspI*) kullanılabileceği bildirilmiştir (Lee ve ark., 1998). Alt grupların başarılı bir şekilde sınıflandırılmasında bu 17 restriksiyon enziminin hem laboratuvar bünyesinde hem de sanal olarak uygulanabileceği rapor edilmiştir (Wei ve ark., 2008).

Sınıflandırma ve alt grupların belirleyici çalışmaları sonucunda dünya genelinde yonca bitkisinde en yaygın olan fitoplazmanın Alfalfa witches'broom (AWB) olduğu bildirilmiştir (Khan ve ark., 2002). Ayrıca yonca bitkisinde; İtalya ve Sibirya'da stolbur fitoplazması, Hindistan'da little leaf fitoplazması ve Amerika'da ise aster yellows fitoplazması rapor edilmiştir (Marzachi ve ark., 2000; Starovic ve ark., 2012; Suryanarayana ve ark., 1996; Peters ve ark., 1999). Başka bir çalışmada ise; herkese açık olan GenBank'sında (ncbi.nlm.nih.gov) mevcut bulunan sekans dizilerine dayanarak yonca bitkilerini infekte eden yedi adet 16Sr fitoplazma grubu (I, II, III, V, VI, VII, XII) olduğu bildirilmiştir (Gopurenko ve ark. 2016).

Diğer birçok patojen gibi fitoplazmalarda konukçu içerisinde çok sayıda biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Örneğin; Hameed ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları bir çalışmada fitoplazma etmeninin maş fasulyesinde üzerinde çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri (fenolik birleşikler, protein, POD, CAT, PPO, toplam klorofil, klorofil a ve klorofil b) etkilediklerini rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada; fitoplazma etmeninin limon bitkisi içerisinde bazı birleşikleri değiştirdiği bildirilmiştir (Zafari ve ark., 2012). En eski raporlardan birinde ise, *Catharanthus roseus* bitkisinin gelişimi sırasında fitoplazma etmeni tarafından infekte edilmesi sonucunda klorofil sentezinde bir azalmanın olduğu rapor edilmiştir (Chang, 1977). Bir başka araştırmada; fitoplazma ile infekteli mısır bitkilerinin

protein içeriklerinin sağlıklı mısır bitkilerine kıyasla daha düşük olduğu belirtilmiştir (de Oliveira, 2002). Ayrıca sağlıklı limon (*Citrus aurantifolia*) bitkilerinin yaprakları ile fitoplazmayla infekteli limon bitkilerinin yaprakları kıyaslanmış ve infekteli bitkilerde protein içeriğinde bir azalma gözükürken, peroksidaz (POX) aktivitesinde bir artış olduğu bildirilmiştir (Zafari ve ark., 2012). Maize bushy stunt fitoplazması ile infekteli mısır bitkilerinin sağlıklı bitkilere kıyasla düşük klorofil içeriğine sahip olduğu ve yüksek fenol bileşikleri içerdiği bildirilmiştir (Junqueira ve ark., 2004). Bu tarz değişiklikler üzerine son yıllarda birkaç çalışma yapılmıştır. Ancak fitoplazma ile infekteli yonca bitkileri savunma yanıtları ve salisilik-jasmonik asit seviyeleri hakkında çok az bilgi mevcuttur. Özellikle, savunma genlerinin aktivasyonunda jasmonik-salisilik asit önemlidir (Derksen ve ark., 2013). Ayrıca fitoplazma ile enfekteli olan yonca bitkilerinin savunma enzimlerinin dirençlerini gösteren prolin ve MDA seviyeleri hakkında herhangi bir çalışma söz konusu değildir. Prolin ve MDA birikimi; biyotik ve abiyotik streslerden kaynaklanan ve streslere yanıt olarak konukçu bünyesinde meydana gelir. Bu nedenle prolin ve MDA seviyelerinin belirlenmesi, fitoplazma-yonca etkileşimlerinde meydana gelen sistemik reaksiyonlarındaki yolun belirlenmesi için önemlidir. Bu nedenler doğrultusunda fitoplazma ile infekteli ve sağlıklı yonca bitkilerinde klorofil, fenol, peroksidaz (POX) ve katalaz (CAT) aktiviteleri, protein, jasmonik asit (JA), salisilik asit (SA), prolin ve MDA içeriklerinin belirlenmesi ve kıyaslanması için meydana gelen biyokimyasal değişiklikler araştırılmıştır.

Araştırmamızdaki amaçları sıralayacak olursak;

1. Şanlıurfa ilindeki yonca üretim alanlarında fitoplazma açısından fitoplazma hastalığının PCR (direkt-PCR, nested-PCR) yöntemiyle saptanması ve yaygınlığının belirlenmesi
2. Elde edilen PCR ürünlerinin dizileme işlemleri tamamlanarak dizi sekanslarının oluşturulması ve bu sekansları kullanılarak MEGAX programı yardımıyla filogenetik ağacını oluşturularak etmenin karakterizasyonunun belirlenmesi
3. Enfekteli bitkiler içerisinde meydana gelen biyokimyasal değişikliklerin saptanması
4. Enfekteli bitkiden sağlıklı bitkiye taşınma yollarının araştırılması

5. Hastalığın olası yabancı ot konukçularının araştırılması amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Türkiye’de Fitoplazmalarla İlgili Yapılan Çalışmalar;

Çağlar ve Elbeaino (2013), Türkiye’nin Adana bölgesinde üç farklı bahçe üzerinde iki yıl boyunca yürütülen çalışmada California privet (*Ligustrum ovalifolium* Hassk.) bitkilerinde gözlemlenen sararma, cadı süpürgesi oluşumu, geriye doğru ölüm ve çökme gibi semptomlar incelenmiş ve bu etmenin Turkish *Ligustrum witches’ broom* (TuLiWB) fitoplazması olarak adlandırılarak, %92 oranı ile en çok 16SrII (peanut witches’ broom) grubuna benzediğini rapor etmişlerdir.

İkten ve ark. (2014), susam bitkisi üzerine yıkıcı etkileri olan phyllody hastalığının susam bitkilerinde meydana getirdiği semptomları, etiolojisi, taksonomisi ve vektörleri araştırılmış ve yapılan moleküler çalışmalar sonucunda etmenin pigeon pea witches’-broom 16SrIX-C ve peanut witches’-broom 16SrII-D alt gruplarına dahil olduğu ve vektörünün *O. Orientalis* olduğunu rapor etmişlerdir.

Özdemir ve Cagirgan (2015), Antalya Üniversitesi deneysel susam çalışma alanında doğal olarak oluşan bir jüt bitkisinde phyllody, anormal çiçek oluşumu, sararma, yaprak boyutunda azalma ve kısa internod belirtilerinin görülmesi üzerine çalışmalar yürütülmüş. Yapılan bir dizi moleküler analizler sonucunda etmenin daha önceki yıllarda aynı deneme alanında bulunan susam bitkisinde tespit edilen 16SrII grubu fitoplazma olduğu ve gelecek yıllarda doğal olarak yetişen bu jüt bitkisinin muhtemelen inokulum kaynağı olacağını rapor etmişlerdir.

Özdemir (2018), 2012-2014 yılları arasında Antalya’da susam yetiştiriciliği yapılan tarlalarda susam phyllody hastalığının vektörlerinin belirlenmesi için toplamda 65 böcek örneği toplamış ve bir dizi moleküler çalışma sonucunda *N. haematoceps* vektörü bünyesinde üç farklı fitoplazma olduğu ve bu fitoplazmaların;

peanut witches'-broom (16SrII); clover proliferation (16SrVI); ve pigeon pea witches'-broom (16SrIX) grubu fitoplazmalar olduğunu rapor etmiş. Ayrıca restriksiyon enzimleri (RsaI ve TaqI) kullanılarak yapılan PCR-RFLP sonucunda ise bu fitoplazmaların II-D, VI-A ve IX-C alt gruplarına ait olduklarını da bildirmişti.

Ayvacı ve ark. (2021), kaktüs (*Opuntia* sp.) klodlarında görülen renk değişiklikleri, kızarıklık, sürgünlerde çoğalma ve cadı süpürgesi gibi fitoplazma benzeri oluşumlar incelenmiş ve bunun sonucunda etmenin %99.2 oranında 16SrII grubu ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir.

2.2. Yonca Bitkisinde Fitoplazmalarla İlgili Çalışmalar;

Khan ve ark. (2001), Umman'ın Sultanate bölgesinde yer alan yonca tarlalarında yapmış oldukları surveylerde 1-2 yaşındaki yoncaların sürgünlerinde çoğalma ve yapraklarında sararma belirtileri gözlemlerken, 4-5 yaşındaki yoncaların köklerinde ise kardeşlenme belirtileri gözlemlenmiş. Bu belirtileri gösteren bitkilerden toplanan örnekler moleküler çalışmalara [PCR, PCR-RFLP (*RsaI*, *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *EcoRI*, *TaqI*, *Tru9I* ve *Sau3AI*)] tabi tutulmuş ve sonucunda bu etmenin 16SrII (peanut witches' broom) fitoplazma grubuna ait olduğu bildirilmiştir.

Wilson ve ark. (2001), Avustralya'da bazı bitkilerde (susam, maş fasüyesi ve yerfıstığı gibi) fitoplazmaların az bilinen özelliklerini araştırmak için yürütmüş oldukları çalışmada; tek bir yonca örneğinde 16SrII grubu içerisinde yer alan tatlı patates küçük yaprak V4 (SPLL-V4) ırkını ilk kez rapor etmişlerdir.

Khan ve ark. (2002), Umman sultanlığının Al-Batinah, Al-Sharqiya, al-Bureimi ve iç bölgelerinden cadı süpürgesi belirtileri gösteren yonca tarlalarından örnekler toplanmış ve yapılan moleküler temelli analizleri sonucunda etmenin PapayaYC (16SrII grubu) olduğu bildirilmiştir.

Pilkington ve ark. (2003), Avusturalya'nın yonca tarlalarında yürütmüş oldukları çalışmaya göre; yapraklarda ve köklerde fitoplazma benzeri simptomlar incelenmiş ve bu infekteli bitkilerden alınan örnekler 16S-23S rRNA intergenik ara bölgesine (SR) özgü oligonükleotid primerler kullanılarak infekteli ve sağlıklı yonca bitkilerinin DNA'ları üzerinden PCR işlemleri gerçekleştirilmiş, ardından RFLP işlemlerine tabi tutulmuştur. PCR işlemi sonucunda elde edilen sekans dizileme sonucunda oluşturulan filogenetik analize göre Avusturalya yonca sarılığı (ALuY) etmeninin 16SrII gurubu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Jones ve ark. (2005), 2003 yılında Bolivya'nın Rio Chico, Limon Pampa bölgesinde bulunan yonca tarlalarında cadı süpürgesi ve küçük yaprak oluşumu simptomları gösteren bitkilerden örnek toplamış ve yapmış oldukları bir dizi moleküler çalışma sonucunda bu etmenin ash witches'broom (GenBank erişim no: AY568302) hastalığı ile %98 oranında benzerlik gösterdiğini ve 16SrI aster yellow ('*Candidatus* Phytoplasma asteris') grubunun bir üyesi olduğu bildirilmiş.

Conci ve ark. (2005), Arjantin'in 'Cuyo' (orta batısında yer alan) bölgesinde bulunan yonca tarlalarında witches'-broom belirtileri görülmüş ve bu belirtileri gösteren bitkilerden aldıkları örnekler öncelikle elektron mikroskop altında incelenmiş ve floemlerinde pleomorfik olarak hastalığı gözlemlemişlerdir. Ardından yürütmüş oldukları PCR ve RFLP çalışmaları sonucunda etmenin 16SrVII (Ash Yellows) grubuna dahil olduğu ancak birkaç farklılıktan dolayı 16SrVII-C alt grubuna dahil edilmesi gerektiği rapor edilmiş.

Getachew ve ark. (2007), Avustralya'da yonca tarlalarında Avustralya lucerne yellow (ALuY) fitoplazmasının büyük sorunlara yol açtığı ve yapılan moleküler analiz sonucunda elde edilen sekans analizine göre etmenin "*Candidatus* Phytoplasma australiense" ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Li ve ark. (2012), 2011 yılının temmuz ayında Çin'in Shaanxi bölgesindeki yonca tarlalarında witches' broom benzeri simptomlar gözlemlemiş ve bu simptomlu bitkiler üzerinde yürütmüş oldukları PCR çalışmaları (universal primerler P1/P6 ve ardından nested primeleri R16F2n/R2) sonucunda elde edilen sekans, filogenetik ve RFLP analizlerine göre etmenin 16SrV-B alt grubu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Starovic ve ark. (2012), Sırbistan'ın üç farklı lokasyonunda bulunan yonca tarlalarında gözlemlenen bodurluk, çoğalma, phllody, yapraklarda sararma ve kızarıklık gibi simptomlar incelenmiş ve yürütmüş oldukları moleküler çalışmalar sonucunda etmenlerin 16SrIII-B ve 16S rXII-A gibi iki farklı fitoplazma grubuna ait olduklarını rapor etmişlerdir.

Hosseini ve ark. (2013), İran'nın Orta ve Güney Doğu eyaletlerindeki yonca tarlalarında küçük yaprak oluşumu, sararma ve cadı süpürgesi şeklinde simptomlar gözlemlemişler ve bunun sonucunda yürütmüş oldukları DNA, PCR ve diğer moleküler temelli analizlerin sonucunda bu fitoplazmanın 16SrII-D alt grubu ile ilişkili olduğu rapor edilmiş.

Al-Saleh ve ark. (2014), Suudi Arabistan'ın Riyad bölgesinde alfalfa witches'-broom fitoplazmasının böcek vektörlerinin tespiti için yürütmüş oldukları çalışmada 84 yonca örneğinin 54'ünün, 94 *E. decipiens*'in ise 65'inin pozitif olduğu ve bunun 16SrII (peanut witches' broom grubu) ile %97.3-98.8 oranında benzer oldukları rapor edilmiştir.

Esmailzadeh Hosseini ve ark. (2015), yaklaşık 28 yıl önce İran'ın güneyindeki Jiroft bölgesinde alfalfa witches'broom (AWB) hastalığı rapor edildiği, bunu takip eden yıllarda ülkenin tropik ve subtropik bölgelerinde hastalığın yaygınlığının görülmesi ve yonca tarlalarında görülen yapraklarda küçülme-sararma, boğum

aralarında kısılma, virescence, phllody, çoğalma, kısırılık, cadı süpürgesi ve yapraklarda kıvrılma gibi simptomların incelenmiş ve bunun sonucunda bu etmenlerin 16SrI, 16SrII, 16SrVI ve 16SrXII gruplarında sınıflandırılmıştır. Ayrıca bu derlemede *Prosopis farcta* ve *Cararia draba* AWB'nin doğal konukçuları olarak rapor edilmiştir.

Gopurenko ve ark. (2016), yürütmüş oldukları çalışmada kloroz ve cadı süpürgesi sergileyen 26 yonca bitkisi, infekteli yonca tarlası içerisinde 12 farklı tür toplamda 38 yabancı ot ve 106 hemipter vektör toplanmış ve bir dizi moleküler çalışmalar yapılmıştır. Moleküler çalışmalar sonucunda yonca örneklerin 26'sının 11'i ve vektör örneklerinin 106'sının 9'u fitoplazma ile infekteli olduğu ancak yonca örneklerinin 9'unun sekans analizlerinin elde edildiği ve sekans analizleri sonucunda 2 örneğin >99.8 oranında 16SrII-A alt grubu ile 7 örneğin ise >99.9 oranında *Stylosanthes little leaf* [StLL] fitoplazması ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Girsova ve ark. (2017), Rusya da baklagillerin yetiştiriciliği açısından ekonomik önem arz eden dört farklı bölgede 2009-2013 yılları arasında baklagil bitkilerinden (özellikle yonca ve üçgül) survey yapılmış ve bunun sonucunda simptom gösteren toplamda 22 farklı baklagil türünden 161 örnek toplanmış. Toplanan örneklerin 103'ü pozitif sonuç vermiş ve toplamda 4 grup (16SrI, 16SrIII, 16SrVI ve 16SrXII) ve 6 alt gruba (16SrI-B, 16SrI-C 16SrIII-B, 16SrIII-F, 16SrVI-A ve 16SrXII-A) ait oldukları rapor edilmiş.

Omar (2017), Suudi Arabistan'ın Qassim bölgesinde yonca ve sebze tarlalarında 2015 yılı içerisinde yapmış olduğu surveyler sonucunda fitoplazma ile bulaşık olduğunu düşündüğü bitkilerden örnek toplamıştır. Ardından yürütmüş olduğu moleküler çalışmalar sonucunda yonca bitkileri ile bulaşık olduğu belirlenen fitoplazmanın 16SrII grubu içerisinde yer aldığı rapor edilmiştir. Diğer yandan çalışmada bir yıllık yonca tarlalarında bulaşıklık oranının %3.14 olduğu ve üç yıllık tarlalarda ise bulaşıklık oranının %77.48 olduğu bildirilmiştir.

Tahir ve ark. (2017), 2016 yılında Sudan’da yürütmüş oldukları çalışmada dört farklı yonca tarlasında (her biri yaklaşık 60 ha) yapraklarda sararma ve bodurluk belirtileri gösteren bitkilerden örnekler alınmış moleküler analizlere tabi tutulmuş ve elde edilen sekans sonuçlarına göre 16SrII- *Ca. phytoplasma aurantifolia* ile %99 oranında benzerlik gösterdiği bildirilmiştir.

Al-Subhi ve ark. (2018), Ummad’da yetiştiriciliği yapılan 11 önemli ürün üzerinde tipik fitoplazma enfeksiyonu belirtileri gözlemlemiş ve bu enfekteli bitkilerden alınan örnekler 16S rRNA, *secA*, *tuf*, *imp* ve SAP11 genelerinin amplifikasyonu ve sekansları izlenerek elde edilen dizilerin peanut witches’broom (16SrII-D) >%99 benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Al-Kuwaiti ve ark. (2019), Irak’ta kum zeytini [*Dodonaea viscosa subsp. Angustifolia* (L. f.) J.G. West], börülce [*Vigna unguiculata* (L.)] ve yonca (*Medicago sativa* L.) üzerinde küçük yaprak ve cadı süpürgesi belirtileri gözlemlemişler ve bu belirtileri gösteren bitkilerden örnekler alarak moleküler temelli testlere tabi tutmuşlar. Elde edilen sekanslar sonucunda yonca bitkilerinde mevcut olan fitoplazma etmeninin *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* (16SrII-D alt grup) ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

2.3. Fitoplazma- Konukçu Etkileşimleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar;

Doi ve ark. (1967), elektron mikroskobu ile ilk kez fitoplazmaları görüntülediler ve daha önceleri virüs olarak adlandırılan bu patojenin aslında mikoplazma benzeri bir organizma olduğunu rapor etmişlerdir.

Ploaie (1981), tarafından yapılan bir araştırmada; fitoplazmaların bitkilerin floem dokuları ile beslenen Cicadellidae (Yaprak pireleri), Fulgoridae (planthopper)

ve Psyllidae familyalarında yer alan vektörler ile hastalıklı bitkilerden sağlıklı bitkilere taşındığı bildirilmiştir.

Lee ve ark. (2000), fitoplazmaların boyutlarının 200-800 nm arasında değişebilen, hücre duvarı barındırmayan, prokaryot hücre yapısında, polimorfik yapıya sahip ve yalnızca canlı hücre ihtiva eden konukçular üzerinde yaşayan obligat bir parazit olduğunu bildirmiştir.

Seemüler ve ark. (2002), yürütmüş oldukları bir çalışmada; fitoplazmaların floem dokularında bulunan, konsantrasyonlarında dönemsel olarak farklılıklar gösteren ve bitki bünyesinde düzensiz dağılım sergileyen bir patojen olduğunu belirtmişlerdir.

Weintraub ve Beanland (2006)'ın hazırlamış oldukları derlemede; fitoplazmaların Cicadellidae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae ve Derbidae familyalarına ait böcekler tarafından taşındığı belirtilmiştir.

Bertaccini (2007), fitoplazma tarafından enfekte edilmiş bitkilerde normal büyüme sürecinde mevcut olan düzenleyiciler dengesinde bozulmalar sergileyerek virescence/phlloidy, çiçeklerde kısırlık, tomurcuklarda çoğalma, cadı süpürgesi, internod uzama ve bodurluk gibi simptomların ortaya çıkmasına neden olduklarını bildirmişlerdir.

Musetti ve ark. (2010), yürütmüş oldukları; Elma ağaçlarında, elma çoklu sürgün fitoplazmasının iyileşme sırasında elma ağaçlarının yaprak floemlerin de anormal kalloz ve floem- protein birikimi belirlenmiş. Enfeksiyona bağlı olarak oluşan kalloz birikimi ve floem-protein agregasyonu Ca^{2+} birbirleri ile bağımlı süreçler olduğundan, floem plazma membranından içe doğru bir Ca^{2+} akışı gerçekleştirerek

elma ağaçlarını iyileştirmek adına savunma mekanizmalarını aktive etmek için bir sinyal olarak işlev olabileceği bildirilmiştir.

Nanda ve ark. (2010), tarafından ROS'un geçici üretimi, bitki-patojen etkileşimlerinin ilk olaylarında tespit edildiği ve patogeneze sinyal transdüksiyon regülatörlerinde önemli bir sinyal olarak rol oynadığı bildirilmiştir.

Galetto ve ark. (2011), yürütmüş oldukları bir çalışmada kasımpatı ve 'Flavescence Dorée' fitoplazma etmenlerinin farklı sıcaklıklar ve CO₂ koşullarında böcek vektörleri (*Euscelidius variegatus* Kirschbaum, *Scaphoideus titanus* Ball) ve farklı bitki konukçularında (*Vitis Vinifera* (L.), *Vicia Faba* (L.) ve *Avena Sativa* (L.)) bu iki fitoplazmanın çoğalma şekillerini incelemişler ve daha sıcak koşullar altında daha hızlı olduklarını rapor etmişlerdir.

Underwood (2012), tarafından kaleme alınan derlemede; Patojenler bitki bünyesine girer girmez papilla olarak adlandırılan hücre duvarı birikmesi yoluyla hücre duvarının fungal ve bakteriler dahil olmak üzere çok sayıda patojeni erken algılanmasına bir yanıt oluşturabileceğini ve çeşitli patojenik mikroorganizmalara sürekli maruz kalınması durumunda bitkinin hem yapıcı hem de koruyucu savunma mekanizmaları geliştirebileceğini bildirmiştir.

Musetti ve ark. (2013), tarafından fitoplazma enfeksiyonunun floem ve kalbur boruları üzerinde etkilerini incelemiş ve bunun sonucunda fitoplazma enfeksiyonunun kalbur tüplerinde Ca⁺² akışı getirerek kalloz birikmesini veya protein tıkanması ile kalbur borularının tıkanmasına yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca Ca²⁺ akışının iletken elementlerin hücre duvarının kalınlaşmasını sağlayabileceği de bildirilmiştir.

Bertacini ve ark. (2022), tarafından yapılan çalışmada; ‘*Candidatus Phtoplasma*’ cinsinin moleküler ve biyokimyasal olarak eksik karakterize edilmesi ve bu eksikliğin giderilmesi için artan moleküler çeşitliliğin kullanılarak, tam veya neredeyse tam 16S rRNA gen dizilerinin yeniden sekans kimlikleri paylaşılmış ve bu yeni oluşturulan sekanslar için dizilerin >98.65 olarak sekans kimlikleri yeniden revize etmişlerdir.

Dikilitaş ve ark. (2019), tarafından yapılan bir çalışmada; bitkilerin dolaylı veya doğrudan abiyotik ve biyotik stres faktörleri ile karşılaştıklarında bu stres faktörlerine karşı değişik bazı metabolik faaliyetler ortaya koyduğunu. Ayrıca diğer tüm organizmalarında süre gelen işleyişleri sırasında karşılaştıkları abiyotik ve biyotik stres faktörleri sonucunda da hücre içerisinde de değişik metabolik faaliyetlerinde meydana geleceği belirtilmiştir.

2.4. Biyokimyasal Çalışmalar

Chang (1977)’nin yürütmüş olduğu bir araştırmada fitoplazma ile infekteli olan *Catharanthus roseus* bitkisinin klorofil içeriğinde belirgin bir azalma olduğu bildirmiştir.

de Oliveira ve ark. (2002), Brezilya’da mısır bitkisinde en fazla gözlemlenen maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) ve corn stunt spiroplasma (CSS) hastalıklarının mısır gelişimi üzerine etkileri incelenmiş. Çalışmanın sonucunda infekteli bitkiler daha az geliştiği, farklı oranlarda besin alımının düştüğünü ve bunun sonucunda enfekteli bitkilerin daha az protein içeriği gösterdiğini bildirmişlerdir.

Maust ve ark. (2003), Meksika’da hindistancevizi (*Cocos nucifera*) yetiştiriciliği yapılan bölgelerde ciddi sorun yaratan ölümcül sararma (LY) olarak adlandırılan fitoplazma etmeni üzerinde yürütmüş oldukları çalışma sonucunda;

etmenin bitkide sırasıyla, erken meyve düşümü, nekroz oluşumu, yapraklarda kloroz, yaşlanma ve son olarak bitkide ölüm gibi simptomları gösterdiklerini bildirilmişlerdir. Ayrıca simptomların görünmeye başlanmasından önce bitki bünyesinde fizyolojik bazı değişikliklerin meydana geldiğini; örneğin, fotosentetik oranlarda ve kök karbonhidrat konsantrasyonlarında azalmalar olmasına rağmen yaprak karbonhidrat oranlarında artış gözlemlediklerini rapor etmişlerdir.

Bertamini ve ark. (2004), Grapevine Leafroll enfeksiyonunun asma (*Vitis Vinifera* L.) yaprakları üzerinde fotosentetik pigmentler, çözümlü proteinler, ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz (RUBP), nitrat redüktaz, fotosentetik aktiviteler ve tilakoid membran proteinlerindeki değişiklikler araştırılmış ve etmen ile bulaşık yaprakların toplam klorofil, karotenoidlerinde, çözümlü protein ve RUBP seviyelerinde azalma olduğu, diğer yandan fotosentetik oranı, stomatal iletkenlik ve terleme oranlarında önemli derecede azalma olduğunu da rapor etmişlerdir.

Junqueira ve ark. (2004), Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) ile enfekteli mısır bitkilerinde meydana gelen biyokimyasal değişiklikleri araştırmak için dayanıklı ve duyarlı hibrit çeşidi kullanarak protein, fenol, klorofil ve şeker içerikleri incelendi. Azalan klorofil içeriği dışında, her iki hibrit içinde diğer tüm parametrelerde artış olduğu rapor edilmiştir.

Zafari ve ark. (2012), *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia ile enfekteli limon bitkileri içerisinde meydana gelen biyokimyasal değişiklikleri incelemiş ve polifenol (PPO), peroksidaz (POX) ve süperoksit (SOD) aktivitelerinin sağlıklı bitkilerden ziyade enfekteli bitkilerde daha fazla olduğu. Diğer yandan klorofil, oksin, protein ve toplam çözümlü/azalan şeker içeriklerinde azaldığını böylece etmenin fotosenteze ve yaşlanmaya müdahale edebileceğini bildirilmiştir.

Rusjan ve Mikulic-Petkovsek (2015), Bois noir (BN) fitoplazmasının asmaların (*Vitis vinifera* cv.) sürgün/çubuklarında lignifikasyon ve fenolik maddeler üzerinde meydana getirdikleri değişiklikler incelenmiş ve bunun sonucunda asma çubuklarında lignifikasyon aşamalarında flavonoid ve stilbenoidleri etkileyerek bitkiyi olumsuz etkileyebileceğini bildirmişlerdir.

Hameed ve ark. (2017), Maş fasülyesi üzerinde dünya genelinde sorun teşkil eden phyllody hastalığı üzerinde yürütmüş oldukları çalışmada; etmenin konukçu üzerinde meydana getirdiği pato-fiyolojik değişiklikler incelenmiş ve toplam fenol oranının dört genotipte, protein içeriğinin iki genotipte, POD'un dört genotipte, PPO'un bir genotipte, PAL'in iki genotipte önemli ölçüde arttığını ancak CAT ve Klorofil a, b ve toplam klorofil oranlarında tüm genotiplerde önemli ölçüde azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Negro ve ark. (2020), tarafından üzüm bitkilerinde önemli verim kayıplarına neden olan *Candidatus* phytoplasma solani'nin *Vitis Vinifera* L. yapraklarında fenilpropanoid yolunda sentezlenen ikincil metabolikler üzerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiş. Fenol ve flavonoid üretiminde belirgin bir artış, lignin içeriğinde ise paralel bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

2.5. Yonca-Fitoplazma Vektörü ile İlgili Yapılmış Çalışmalar;

Pilkington ve ark. (1999), Avustralya'nın tohum endüstrisinin büyük bir kısmını oluşturan yonca tohumlarında ciddi verim kayıplarına neden olan yonca sarılığı hastalığı üzerine yürütülmüş olan bir çalışmada; 8 tohum firması ve 62 çiftçiden elde edilen bilgiler değerlendirilmiş ve bu etmenin her iki eyalette de yaygın olarak meydana geldiği ve şiddetinin önemli ekonomik kayıplara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Esmailzadeh-Hosseini ve ark. (2011), İran'da alfalfa witches'broom (AWB) fitoplazma konukçuları 2007-2009 yılları arasında araştırmış ve bunun sonucunda *Prosopis farcta* (Banks & Soland.) Macbr ve *Cardaria draba* (L) Desv. Bitkilerinden elde edilen etmen birbirine benzer oldukları ve ajanın Yazd AWB (peanut witches'broom) fitoplazması olduğu rapor edilmiş.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Araştırmanın gerçekleştirildiği yer ve kullanılan bitki materyalleri

Çalışmada moleküler ve biyokimyasal analizler Harran Üniversitesi- Ziraat Fakültesi- Bitki Koruma Bölümünde yer alan laboratuvarlarda ve cam seralarda gerçekleştirilmiştir. Şanlıurfa iline bağlı Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde yer alan yonca tarlalarında fitoplazma belirtisi gösteren yonca bitkileri ve yabancı otlar araştırma materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.2. PCR ve Sekans dizileme çalışmalarında kullanılan materyaller

3.1.2.1. PCR (Direkt-PCR ve Nested-PCR) ve Elektroforez Çalışması İçin Kullanılan Malzemeler;

PCR işlemi esnasında; Nükleazsız PCR suyu (Thermo), kapaklı santifüj tüpü (1.5-2ml), kapaklı PCR tüpü (0.2ml), Taq polimeraz (DreamTaq Thermo), PCR buffer (Thermo), dNTP setler (Thermo), primer çiftleri (R16F1/R0- R16F2n/R2), negatif ve pozitif kontrol ürünleri, otomatik pipetler (0-1µl, 1-10µl, 10-20µl, 20-100µl, 100-1000µl) (Brand), otomatik pipet uçları (Brand), Thermocycle cihazı (Thermo), elektroforez tank ve güç monitörü (Biorad), agaroz (Sigma), Tris-acetate-EDTA (TAE) (Thermo), marker (Thermo), etidyum bromid (Sigma), UV transilluminatör, mikrodalga, buzdolapları ve dondurucular (-20°C ve -80°C), raklar ve eldivenler kullanılmıştır.

3.1.2.1. Sekans analizleri sonrasında kullanılan program

Sekans analizlerinin değerlendirilmesinde MEGAX programı kullanıldı (MEGAX).

3.1.3. Biyokimyasal analizlerde kullanılan ekipmanlar

Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasallar; (NaH₂PO₄, Coomassie Brilliant Blue G-250, Bovine Serum Albumin Fraction V (Sigma), Aseton, Methanol, Folin-Ciocalteau, Na₂CO₃, Glacial asetik asit, Fosforik asit, Ninhidrin, Sülfosalisilik asit, Tolüen, L-prolin, Trikloroastik asit (TCA), Thiobarbituric asit (TBA), Guaiacol, H₂O₂, Na₂EDTA, Etanol, FeCl₃).

3.1.4. İstatistik analiz için kullanılan program

Çalışmada elde edilen verilerin öncelikle Excel programına (Microsoft 365®) aktarılarak grafikleri oluşturulmuştur. Ardından verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde Windows versiyon 20.1 yazılımı (Minitab Inc., State College, PA, USA) kullanılmıştır (Minitab Inc., 2020).

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki materyallerinin toplanması

Bu çalışmada kullanılan bitki materyalleri 2020-2022 yılları arasında Şanlıurfa'nın Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde yonca yetiştiriciliği yapılan tarlalardan temin edilmiştir. Sararma, kızarıklık, bodurluk veya cadı süpürgesi gibi belirtiler gösteren bitkilerden güdümlü örnekleme ile toplamda 86 yonca ve 39 yabancı ot örneği toplanmıştır (Şekil 3.1). Alınan örnekler sırasıyla; ayrı ayrı poşetlenmiş ve etiketleme (yer, tarih ve gözlemlenen semptom vb.) işlemleri gerçekleştirilmiştir. Etiketleme işlemi sonrasında soğuk zincir koşulları (4-6°C)

altında laboratuvara getirilerek -20°C 'de (DNA ve biyokimyasal analiz çalışmaları gerçekleştirinceye kadar) muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Şanlıurfa ili Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde yer alan yonca tarlalarından yonca ve yabancı ot örnek toplanmıştır

Ayrıca tarlalardan kızarıklık, sararma, bodurluk ve cadı süpürgesi gibi belirtiler gösteren bitkiler tarladan kökleriyle beraber alınarak saksılara dikilmiş ve sera koşulları altında çalışmalarda kullanılmak için muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA ekstraksiyonu

Ahrens ve Semmüller (1992) tarafından hazırlanan protokol belirtiler gösteren örneklerin DNA izolasyonları için kullanılmıştır. Bu protokole göre;

1. Öncelikle her bir bitkiden 1 gr tartılarak ekstraksiyon poşeti içerisine yerleştirilmiştir. Ardından ekstraksiyon poşeti içerisine daha önceden hazırlanmış olduğumuz CTAB buffer'dan (pH:8) 4 ml eklenerek homojenizatör ile ezilmiştir.

2. Elde edilen ekstraksiyon 1.5 ml'lik santifüj tüplerine alınarak 5000 rpm'de 5 dk santifüj edilmiştir (+4°C).
3. Santifüj işleminden çıkan tüplerin üst faz kısmından 600 µl alınarak steril 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmış ve 65°C'de 30 dk boyunca kuru ısıtıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyondan alınan tüplerin üzerine 600 µl kloroform-izomilalkol (24:1) ilave edilerek 1 dk vortekslenmiş ve ardından 12000 rpm 15 dk santifüj işlemine tabi tutulmuştur (+4°C). (Bu aşama iki kez tekrarlanmıştır.)
5. Tamamlanan bu aşama sonrasında oluşan üst fazdan 300 µl alınarak temiz santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Üzerine 300 µl isopropanol (-20 °C) eklenerek 1 dk vortekslenerek -20 °C'de 1 saat bekletilmiştir.
6. -20 °C'de çıkartılan tüpler 12000 rpm'de 15 dk santrifüj (+4 °C) işlemine tabi tutulmuştur.
7. İşlem sonrasında tüplerin sıvı kısmı dökülerek üzerine 1000 µl % 70'lik etanol (-20 °C) eklenerek 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj işleminden çıkan tüplerin sıvı kısmı dökülerek kurutulmaya bırakılmıştır.
9. Kuruma işlemi sonunda 50 µl Tris-EDTA (1×) eklenerek örnekler +4 °C bir gece bekletilmiştir. Ardından örnekler kullanılncaya kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

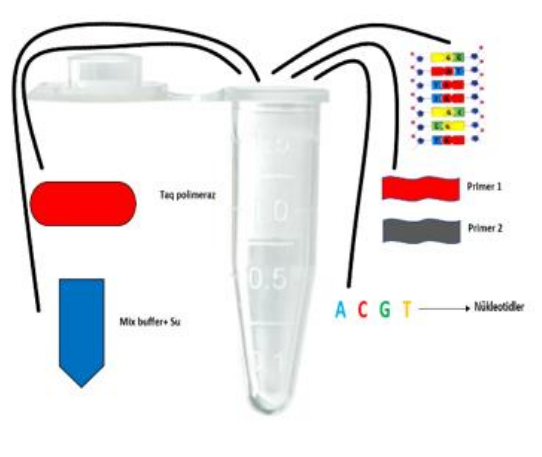
3.2.3. PCR Çalışmaları

PCR amplifikasyon işlemi ile hedef bölgenin çoğaltılması amaçlanır. Koch postülatları fitoplazmaların tanılama işlemi için yeterli olmaması nedeniyle moleküler araçlar kullanılmıştır (Dermastia ve ark., 2017). Bu yüzden tanılama işlemi fitoplazmanın korunmuş gen bölgesi olan 16SrDNA gen bölgesi üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu analiz direkt-PCR ve nested-PCR olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir (Davis and Lee, 1993; Duduk ve ark., 2013). İlk aşamada 1 400 bp bant veren R16F1/R16R0 primer çiftleri, ikinci aşamada ise 1 250 bp bant veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 2.1. Direkt ve nested-PCR işlemlerinde kullanılan primer çiftlerinin baz dizilimleri

Primer Adı	Dizileme (5'-3')	Referans
R16F1	5'-AAGACGAGGATAACAGTGG-3'	Lee ve ark., 1995
R16R0	5'-GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC-3'	Lee ve ark., 1995
R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	Gundersen ve lee, 1996
R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	Gundersen ve lee, 1996

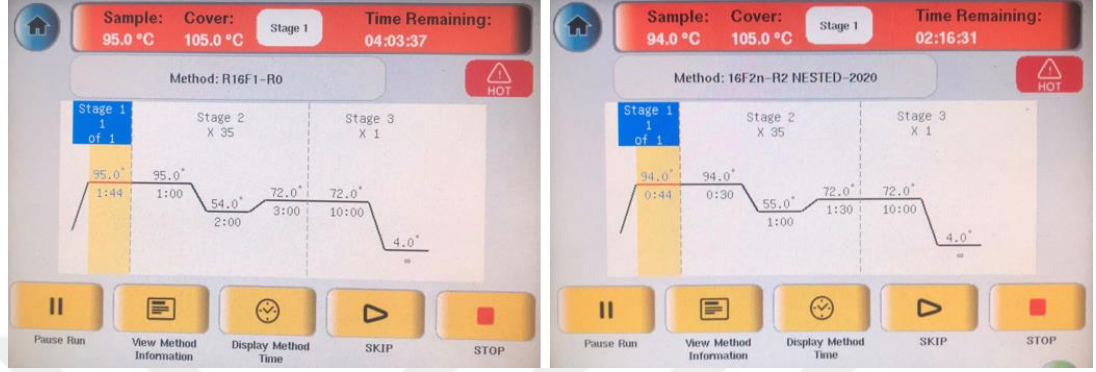
PCR mix için sırasıyla; PCR buffer (10×), ddH₂O, dNTP (10mM konsantrasyon olacak şekilde 100 mM'lik Deoksinükleotid trifosfat (dATP-dCTP-dTTP-dGTP)'ların her birinden 10 µl alınarak 40 µl dNTP karışıma 60 µl ddH₂O eklenerek elde edilmiştir), Primer çifti (R16F1/R16R0 veya R16F2n/R16R2) (20µM), MgCl₂ (10mM), Taq polimeraz (5U/µl) ve DNA ekstraksiyonundan elde edilen nükleik asitler (20-40 ng/µl) dikkatlice eklenerek 0.2 ml'lik tüpler içerisinde işlem yürütülmüştür. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde işlem gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. PCR işleminde bir tüp içerisinde bulunması gereken materyaller; DNA materyali, taq polimeraz, dNTP, primer çifti, mix buffer ve ddH₂O. Çalışmada kullanılan thermocycle cihazı (Thermo)

Elde edilen DNA'lar kullanılarak hazırlanan PCR ürünleri öncelikle direkt-PCR işlemine [95 °C'de 3 dakika boyunca ilk denatürasyon (1 döngü); [95 °C'de 1 dakika denatürasyon; 54 °C'de 2 dakika primer bağlanması (T_m-(3-5)); 72 °C'de 3 dakika uzama] (35 döngü); 72 °C'de 10 dakika son uzama (1 döngü)] tabi tutulmuştur. Ardından direkt-PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılarak nested-PCR işlemine [94

°C’de 2 dakika boyunca ilk denatürasyon (1 döngü); [94 °C’de 30 saniye denatürasyon; 55 °C’de 1 dakika primer bağlanması; 72 °C’de 1:30 dakika uzama] (35 döngü); 72 °C’de 10 dakika son uzama (1 döngü)] tabii tutulmuştur.



Şekil 3.3. Direkt ve nested PCR çalışmalarında uygulanan thermocycle koşulları

Amplifikasyon ürünleri %1’lik agaroz jel içerisinde, 0.5×TAE (67 mmol L-1 Tris-HCl, 22 mmol L-1 acetate acid, 10 mmol L-1 EDTA, pH 0.8) buffer ile dolu olan elektroforez tankı içine alınarak 5 volt/cm yürütülmüştür. İşlem sonrasında jel etidyum bromür (ETBR, 10 mg ml⁻¹) ile boyanarak UV transillüminatör yardımıyla görüntülenmiştir. Pozitif olarak belirlenen tüm bitkilerin DNA sekans analizlerinin yapılması için dizilemeye gönderilmiştir (MedsanTEK).

Dizilemeden gelen forward ve revers dizileri MEGAX programı kullanılarak birleştirilmiş ve tek bir dizi haline getirilmiştir. Ardından MEGAX programı kullanılarak oluşturulan sekans analizleri 49 ‘*Ca. Phytoplasma*’ grup/alt grupları ile karşılaştırılarak filogenetik ağaçları oluşturulmuştur (Bertacini ve ark.,2022).

3.2.4. Küsküt ile bulaşık olan bitkilerin tarladan toplanılması

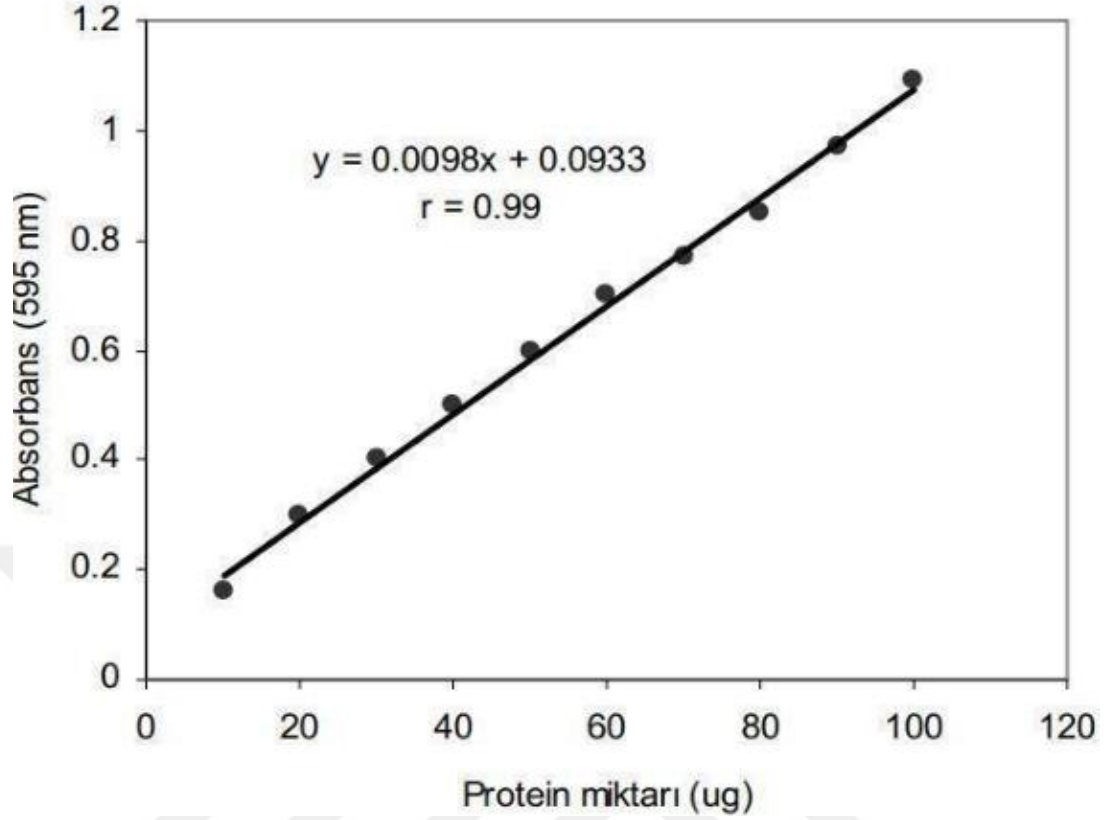
Yonca tarlalarında gerçekleştirilen surveyler esnasında fitoplazma hastalığının belirtilerini gösteren tarla sarmaşığı ve yonca bitkisi arasında oluşan küsküt köprüleri fotoğraflanmış ve bu üç bitki tarladan alınarak etiketlenmiştir. Ardından soğuk zincir koşulları altında laboratuvara getirilmiş ve moleküler çalışmaları gerçekleştirilinceye kadar – 20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Biyokimyasal analizler

Biyokimyasal analizlerin çalışılmasındaki hedef; bitkilerin fitoplazma etmenine karşı bitki bünyesinde meydana getirdiği savunma tepkilerinin incelenmesi için gerçekleştirilmiştir. Enfekteli ve sağlıklı olduğu moleküler analizlerle belirlenen bitkilerden örnekler alınmış ve biyokimyasal analizler için materyal olarak kullanılmıştır. Pozitif olduğu belirlenen bitkilerin aynı zamanda elde edilen DNA dizilerinin de aynı olması ve standart hatanın en aza indirgenmesi için Ceylanpınar yonca izolatu (NCBI erişim numarası: MW048988) kullanılmıştır. Bu sayede, seçilen bu temsilci bitki üzerinden biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Protein içeriğinin belirlenmesi

Protein miktarını belirlemek için Bradford (1976) tarafından hazırlanan protokole göre yaklaşık 0.5 g yaprak örneği alınmış ve 5 ml 50 mmol⁻¹ sodyum fosfat tamponu (pH 7) içerisinde homojenize edilmiştir. Daha sonra, 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 ile 100 µl bitki özü karıştırılmış ve çözelti 595 nm’de okunmuştur. Protein standart eğrisi için farklı konsantrasyonlarda (10-100 ug ml⁻¹) Bovine Serum Albumin Fraction V (Sigma) kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Protein içeriğinin belirlenmesi için Bovine Serum Albumin Fraction V (Sigma) kullanılarak hazırlanan standart eğrisi

3.2.5.2. Klorofil içeriğinin belirlenmesi

Yonca yapraklarının klorofil içeriği, Arnon (1949) tarafından hazırlanan yöntemde küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Karakai ve ark., 2020). Bitkilerden yaklaşık 0.5 g örnek alınarak, 5 ml asetonda:su (80 v/v) içerisinde homojenize edilmiştir. Ardından, sıvı kısım filtre kağıdından geçirilerek elde edilen çözelti ışık geçirmeyen tüplere aktarılmıştır. Daha sonra çözeltinin klorofil *a* 663.5 nm ve klorofil *b* 645 nm'de %80 aseton kontrolüne karşı spektrofotometrede okutulmuştur (Epoch-BioTek). Klorofil içeriği, mg g⁻¹ taze yaprak g. olarak ifade edildiği için aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır (Karakaş, 2013).

$$\text{Toplam klorofil (mg/l)} = 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663.5} \quad (3.1)$$

$$\text{Klorofil } a \text{ (mg/l)} = 12.7 A_{663.5} - 2.69 A_{645} \quad (3.2)$$

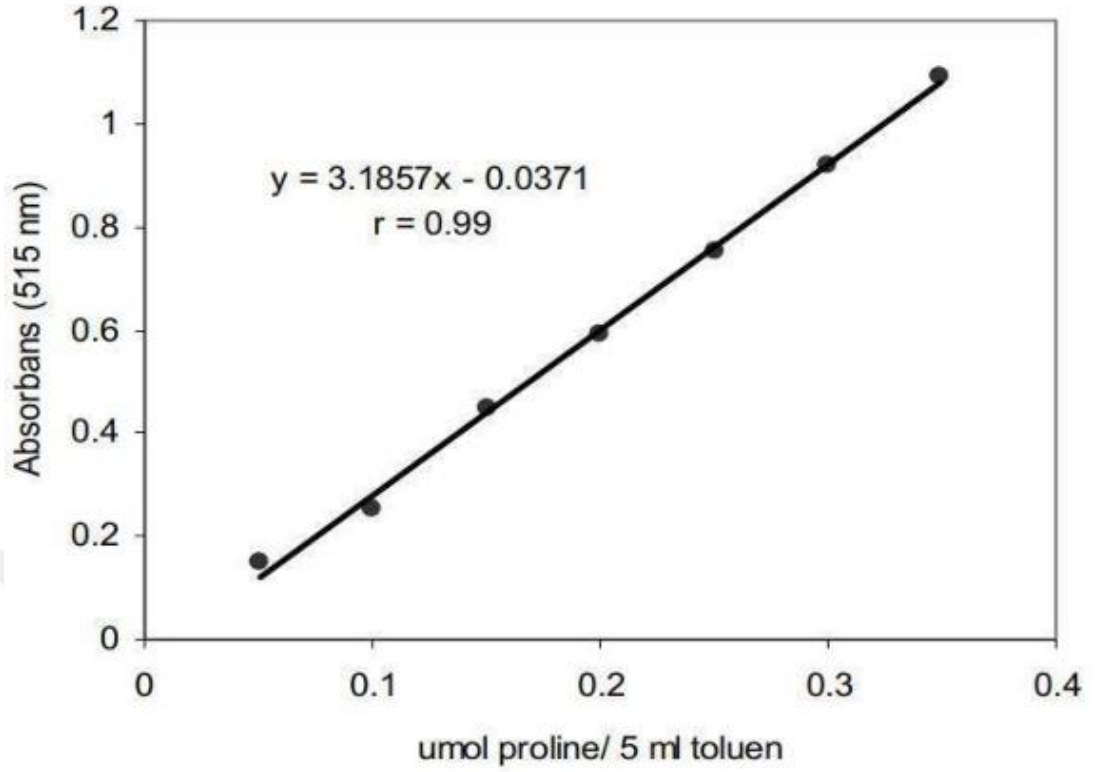
$$\text{Klorofil } b \text{ (mg/l)} = 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663.5} \quad (3.3)$$

3.2.5.3. Fenol içeriğinin belirlenmesi

Shetty ve arkadaşları (1995) tarafından hazırlanmış olan protokolde birkaç küçük modifikasyon yapılarak fenol içeriği belirlenmiştir. Yonca bitkilerinin yapraklarından yaklaşık 0.5 g örnek %80 metanol içinde homojenize edilmiştir. Ardından 95 °C'de 30 dakika inkübe edilerek 10.000 rpm'de 10 dakika santifüj edilmiştir. Toplam fenol içeriğinin belirlenmesi için 300 µl bitki ekstratından alınmış ve 1.5 ml Folin-Ciocalteu (1:10 su ile seyreltilmiş) ilave edilmiştir. Bu aşamadan 5 dakika sonra 1.2 ml %20 Na₂CO₃ ilave edilmiş ve karanlıkta 40 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Renk değişikliğinin belirlenmesi için spektrofotometrede 760 nm'de okutulmuştur (Epoch-BioTek). Fenol içeriği, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.5.4. Prolin içeriğinin belirlenmesi

Bates ve arkadaşlarının (1973) protokolünde bazı modifikasyon yapılarak prolin içeriği belirlenmiştir (Karakaş ve ark., 2021). Analizde renk reaktifi olarak asit-ninhidrin (30 ml glacial asetik asit ve 20 ml 6 mol L⁻¹ fosforik asit içinde 1.25 g ninhidrin çözülmesiyle hazırlanmıştır, 4 °C'de 24 saat muhafaza edilebilir) karışımından oluşan bir bileşik kullanılmıştır. Yonca yapraklarından alınan yaklaşık 0.5 g örnek sıvı azot içerisinde homojenize edilmiş ve üzerine 10 ml %3 sülfosalisilik asit ilave edilerek çözdürülmüştür. Elde edilen ekstrakt daha sonra filtre kağıdından (Whatman No:1) geçirilmiştir. Karışımdan 2 ml alınarak üzerine 2 ml asit ninhidrin ilave edilmiş ve 100 °C'de 1 saat kaynatılmıştır. Reaksiyon daha sonra buz içerisinde soğutulmuştur. Daha sonra reaksiyon karışımına 5 ml tolüen ilave edilerek 30 saniye vortekslenmiştir. Oluşan iki fazın üst kısmı mikropipet yardımıyla alınarak spektrofotometrede 515 nm'de saf tolüen'e karşı okutulmuştur. Standart eğri, farklı konsantrasyonlarda L-prolin'de hazırlanmıştır.



Şekil 3.5. Prolin içeriğinin belirlenmesi için kullanılan L-prolin satandart eğrisi

3.2.5.5. Malondialdehit (MDA) içeriğinin belirlenmesi

Lipid peroksidaz olarak da bilinen MDA analizi için, Heath ve Packer (1968)'in hazırlamış oldukları protokol kullanılmıştır. Protokol üzerinde birkaç modifikasyon yapılmıştır (Karakaş ve ark., 2021). Yaklaşık 0.5 g yonca yaprağı alınmış ve 10 ml % 0.1 trikloroastik asit (TCA) içinde homojenize edilerek 10.000 rpm'de 5 dakika santifüjlenmiştir. Daha sonra ekstraktan 1 ml alınarak üzerine %5 thiobarbituric asid (TBA) içeren 4 ml %20 TCA ilave edilerek karışım 95 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında buz banyosu yardımıyla hızlıca soğutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından 10.000 rpm'de 10 dakika santifüj edilerek üst faz kısmından 300 µl alınarak playtlere aktarılmıştır. Spektrofotometrede 532 nm ve 600 nm'de okuması yapılmıştır. MDA içeriğinin belirlenmesinde aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Karakaş, 2013).

$$\text{MDA (nmol g}^{-1} \text{ taze ağırlık)} = [\text{Ekstrakt hacmi (ml)} \times [(A_{532} - A_{600}) / (155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1})]] / \text{örnek miktarı (gram)}] \times 10^3 \quad (3.4)$$

3.2.5.6. Peroksidaz (E.C.1.11.1.7, POX) aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi için Cvikorova ve arkadaşları'nın (1994) hazırladığı protokolde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (Karakaş ve ark., 2019). Yonca bitkisinden yaklaşık 0.5 g örnek alınmış ve üzerine 50 mmol⁻¹ fosfat tampon (pH 7.0) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Elde edilen ekstraksiyondan 100 µl alınarak üzerine 3 ml reaksiyon (13 mmol L⁻¹ guaiacol, 5 mmol L⁻¹ H₂O₂ ve 50 mmol L⁻¹ sodyum fosfat, pH 6.5) karışımı ilave edilmiştir. Reaksiyon H₂O₂ ilavesiyle başlatılmış ve 1 dakika aralıklarla spektrofotometrede (Epoch-BioTek) 470 nm'de 25 °C'de 3 kez okutulmuştur. Bir birim peroksidaz aktivitesi için ΔA₄₇₀ nm'de 0.1 absorbans/dakika olarak belirlenmiştir. Sonuçlar ünite mg⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.5.7. Katalaz (E.C.1.11.1.6, CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Milosevic ve Slusarenko (1996) tarafından hazırlanan protokolünde küçük modifikasyonlar yapılarak katalaz aktivitesi ölçülmüştür (Karakaş ve ark., 2013). Yoncalardan yaklaşık 0.5 g yaprak örneği alınmış ve 5 ml fosfat tamponu (pH 7.0) eklenerek homojenize edilmiştir. Elde edilen ekstraksiyonun süpernetant kısmından 50 µl alınmış ve üzerine 2.95 ml reaksiyon karışımı (10 mmol L⁻¹ H₂O₂, 50 mmol L⁻¹ sodyum fosfat buffer, pH 7.0 ve 4 mmol L⁻¹ Na₂EDTA) ilave edilmiştir. Playtlere yüklenen örnekler spektrofotometrede (Epoch-BioTek) 240 nm'de 25 °C'de 30 saniye boyunca okunmuştur. Bir birim katalaz enzimi; 1 dakikada 1 µmol H₂O₂'yi parçalayan enzim miktarı olarak ifade edilmiş ve değer ünite mg⁻¹ protein olarak belirtilmiştir.

3.2.5.8. Jasmonik asit (JA) içeriğinin belirlenmesi

Annijeri ve arkadaşları (2011) tarafından hazırlanmış protokole göre jasmonik asit miktarı belirlenmiştir. İlk olarak, 1 g yaprak örneği alınarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 ml etanol içerisinde 12 saat boyunca bekletilmiştir. Yaklaşık 12 saat sonra karışım filtre kâğıdı (Whatman No:1) yardımıyla süzülerek elde edilen ekstraksiyondan alınan örnekler playtlere eklenerek spektrofotometrede (Epoch-

BioTek) 323 nm’de okutulmuştur. JA konsantrasyonunun belirlenmesinde, mutlak etanolde çözüldürülen farklı JA konsantrasyonlarında hazırlanan standart eğri kullanılmıştır.

3.2.5.9. Salisilik asit (SA) içeriğinin belirlenmesi

Rainsford’un (2004) protokolünde küçük modifikasyon yapılarak salisilik asit içeriği belirlenmiştir. Protokole göre; 1 g yaprak örneği alınarak, oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 ml etanolde içerisinde 12 saat boyunca bekletilmiş ardından elde edilen ekstrat karışımı filtre kağıdından (Whatman No:1) geçirilerek 10.000 rpm’de 10 dakika santifüj edilmiştir. Süpernatant kısmından 100 µl alınarak taze hazırlanmış %1 ferric klorür ($FeCl_3$) ilave edilerek toplam hacim reaksiyon karışımı 3 ml’ye tamamlanmıştır. Fe^{3+} iyonu ve SA arasında oluşan karışım (menekşe rengi) spektrofotometrede (Epoch-BioTek) 540 nm’de ölçülmüştür. SA içeriğinin, etanolde hazırlanan 0-100 ppm SA konsantrasyonları arasında değişen standart eğrisine göre hesaplanmıştır.

3.2.6. İstatistik analiz

Fitoplazma ile infekteli ve sağlıklı bitkilerin biyokimyasal analizlerinden sonra Windows versiyon 20.1 yazılımı (Minitab Inc., State College, PA, USA) kullanılarak istatistiksel farkları test edilmiştir. Tüm veriler üç kopya ile çalışılmıştır. \pm standart hata (SH), (n=3).

4. ARAŞTIRMA BULGULAR ve TARTIŞMA

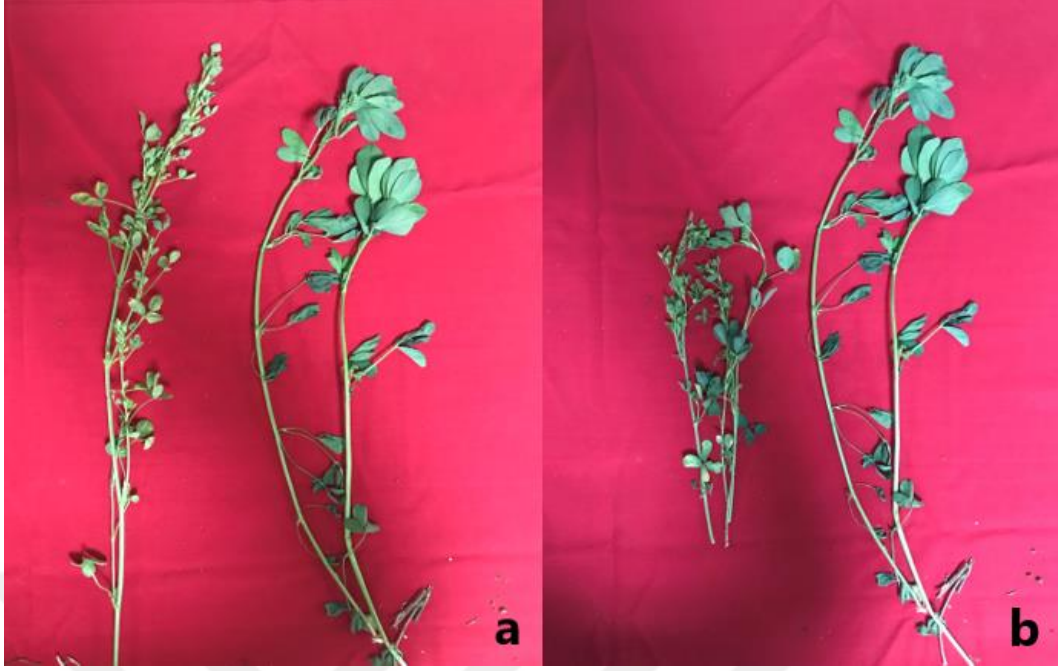
4.1. Yonca Bitkisinde Belirlenen Simptomlar

Şanlıurfa iline bağlı Ceylanpınar, Suruç ve Siverek ilçelerinde yonca yetiştiriciliği yapılan tarlalarda potansiyel olabileceği düşünülen küçük yaprak oluşumu, kızarıklık, sararma, bodurlaşma ve cadı süpürgesi gibi belirtiler gösteren bitkiler gözlemlenmiştir. Diğer yandan tarla içerisinde/kenarında fitoplazma belirtisi taşıyan yabancı otlar da gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. Survey yapılan bir yonca tarlası

Şanlıurfa ili Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde bulunan yonca tarlalarında (Şekil 4.1.) hastalık belirtisi gösteren 86 adet örnek toplanmıştır. Toplanan örneklerin yapraklarında küçük yaprak oluşumu, bodurluk ve sararma (Şekil 4.2.); küçük yaprak oluşumu ve sararma (Şekil 4.3.); kızarıklık, sararma, bodurlaşma ve cadı süpürgesi (Şekil 4.4.) belirtileri saptanmıştır.



Şekil 4.2. Yonca bitkilerinde a) küçük yaprak oluşumu-sararma ve sağlıklı bitki; b) bodurluk ve sağlıklı bitki



Şekil 4.3. Yonca bitkilerinde a-b) küçük yaprak oluşumu ve sararma ve c-d) yapraklarda sararma



Şekil 4.4. Yonca bitkilerinde görülen a) kızarıklık; b) sararma; c) bodurluk ve d) cadısüpürgesi

4.2. Yonca Tarlalarında Bulunan Yabancı Otlar

Yonca tarlalarının kenarlarında ve içerisinde hastalık belirtisi gösteren 39 adet yabancı ot toplanmıştır. Toplanan yabancı otlar Harran Üniversitesi, Ziraat fakültesi,

Bitki koruma bölüm hocalarında sayın Dr. Öğr. Üyesi Shahid FAROOQ yardımıyla *Malva sylvestris* (Ebegümece), *Sonchus asper* (Dikenli eşek marulu), *Convolvulus arvensis* (Tarla sarmaşığı), *Cuscuta spp.* (Küsküt), *Orobancha* (Canavar otu), *Capsella bursa-pastoris* (Çobançantası), *Hordeum murinum* (Pisipisi otu), *Cirsium arvense* (Köygöçerten), *Isatis tinctorio* (Çivi otu) ve *Lolium perenne* (İngiliz çimi) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1.; Şekil 4.5.; Şekil 4.6.).

Çizelge 3.1. İlçelerde yer alan yonca tarlalarından toplanan yabancı ot türleri ve sayıları

	Yabancı ot isimleri	Toplanan örnek miktarı
Ceylanpınar	<i>Malva sylvestris</i> (Ebegümece)	3
	<i>Sonchus asper</i> (Dikenli eşek marulu)	2
	<i>Convolvulus arvensis</i> (Tarla sarmaşığı)	3
	<i>Cuscuta spp.</i> (Küsküt)	3
	<i>Orobancha spp.</i> (Canavar otu)	1
	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (Çobançantası)	2
	<i>Hordeum murinum</i> (Pisipisi otu)	3
	<i>Cirsium arvense</i> (Köygöçerten)	1
	<i>Isatis tinctorio</i> (Çivi otu)	2
	<i>Lolium perenne</i> (İngiliz çimi)	3
Siverek	<i>Malva sylvestris</i> (Ebegümece)	2
	<i>Sonchus asper</i> (Dikenli eşek marulu)	1
	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (Çobançantası)	1
	<i>Hordeum murinum</i> (Pisipisi otu)	1
	<i>Isatis tinctorio</i> (Çivi otu)	1
Suruç	<i>Sonchus asper</i> (Dikenli eşek marulu)	2
	<i>Convolvulus arvensis</i> (Tarla sarmaşığı)	2
	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (Çobançantası)	2
	<i>Hordeum murinum</i> (Pisipisi otu)	1
	<i>Isatis tinctorio</i> (Çivi otu)	2
	<i>Lolium perenne</i> (İngiliz çimi)	1



Şekil 4.5. Yonca tarlalarından toplanan yabancı otlar a) *Isatis tinctorio* b) *Orobanche* spp. c) *Capsella bursa-pastoris* d) *Hordeum murinum* e) *Lolium perenne* f) *Cirsium arvense* ve g) *Sonchus asper*.



Şekil 4.6. Yonca tarlalarında a) *Malva sylvestris* b) *Orobanche* spp. ve c) *Convolvulus arvensis*

4.3. Survey Değerlendirilmesi

Şanlıurfa ili Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde bulunan tarlalardan toplamda 86 yonca bitkisi ve 39 yabancı ot örneği alınmış ve moleküler testlere tabi tutulmuştur. Moleküler analizler sonucunda toplanan 86 yonca bitkisinin 78'i ve 39 yabancı otun 16'sının fitoplazma etmeniyle bulaşık olduğu belirlenmiştir. Ceylanpınar ilçesinden toplanan 56 yonca örneğinin 53 tanesi pozitif olarak belirlenirken, toplanan 23 yabancı ot bitkisinin 10 tanesi pozitif olarak bulunmuştur. Siverek ilçesinden toplanan 10 yonca örneğinin 7 tanesi pozitif bulunurken, toplanan 6 yabancı ot bitkisinin 1 tanesi pozitif olarak bulunmuştur. Suruç ilçesinden toplanan 20 yonca bitkisinden 18 tanesi pozitif olarak bulunurken, toplanan 10 yabancı ot bitkilerinin 5 tanesi pozitif olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Ceylanpınar, Siverek, Suruç ilçelerinden toplanan yonca ve yabancı otların fitoplazma ile bulaşıklık durumu

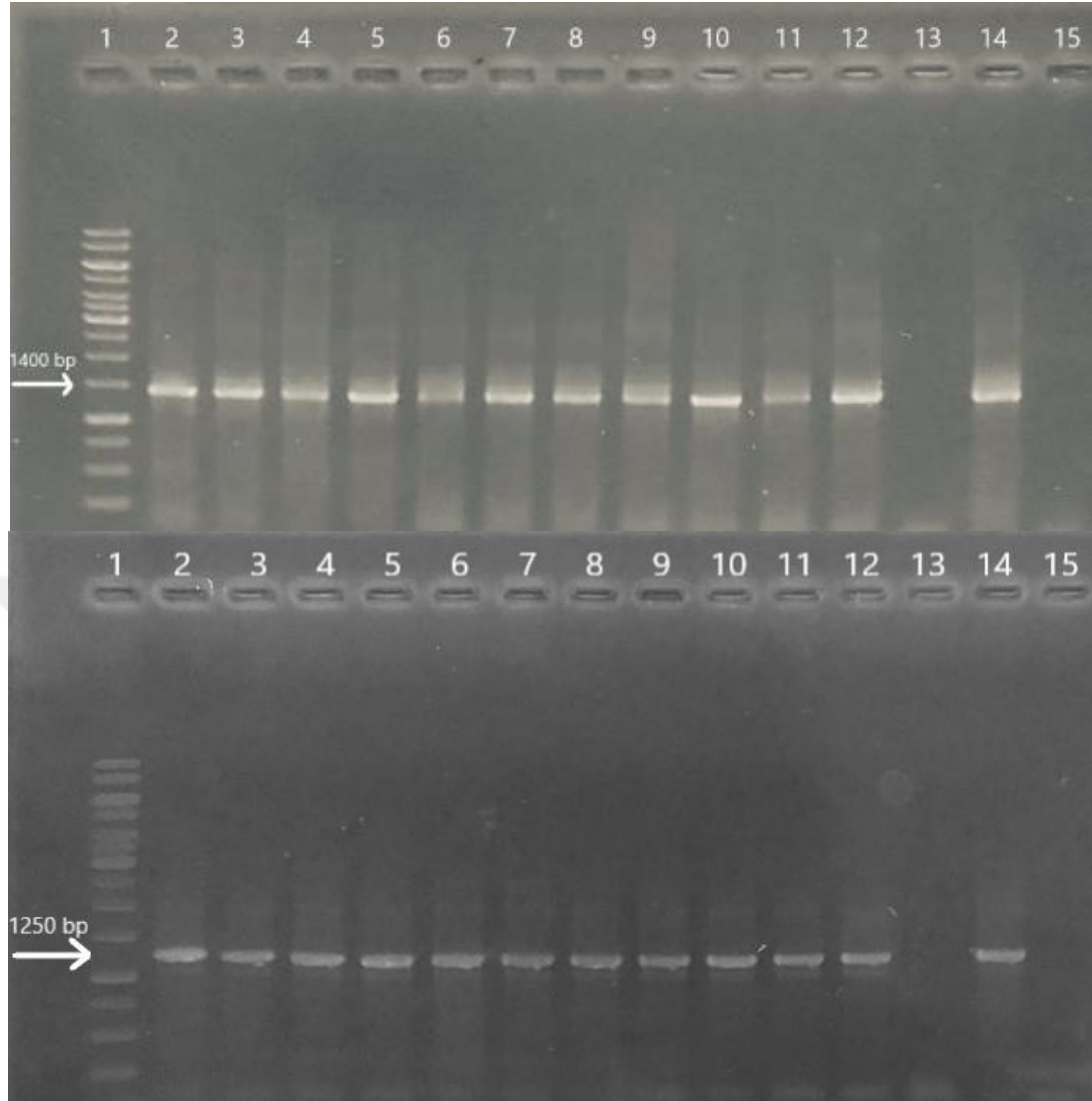
İlçeler	Toplanan yonca bitki sayısı	Pozitif yonca bitki sayısı	Toplanan yabancı ot sayısı	Pozitif Yabancı ot sayısı
Ceylanpınar	56	53	23	10
Siverek	10	7	6	1
Suruç	20	18	10	5

4.4. Yabancı Otlarda Saptanan Fitoplazmalar

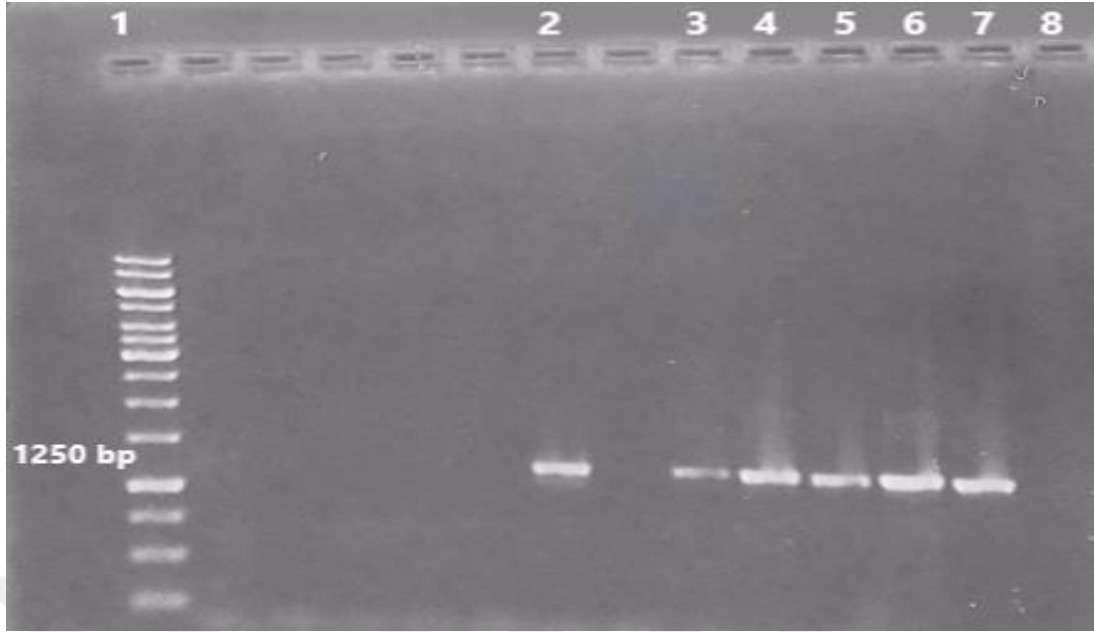
Yonca tarlalarından sırasıyla toplanan yabancı otlar; Ceylanpınar'da *Sonchus asper*, *Convolvulus arvensis*, *Cuscuta* spp., *Orobanche* sp. ve *Lolium perenne*; Siverek'te *Sonchus asper* ve Suruç'ta *Sonchus asper*, *Convolvulus arvensis* ve *Lolium perenne* bitkilerinin fitoplazma ile infekteli olduğu belirlenmiştir.

4.5. Moleküler Teknikler Kullanılarak Fitoplazmaların Tanınması

Fitoplazmaların tanınması farklı birkaç aşama sonucunda belirlenir. Bu aşamalardan ilki; direkt-PCR ve nested-PCR olarak iki adımda gerçekleştirilmiştir. Fitoplazmaların belirlenmesinde kullanılan 16S rRNA geni üzerinde yer alan spesifik kısmın çoğaltılması için R16F1/R16R0 primerleri kullanılarak direkt-PCR işlemi gerçekleştirilmiş ve 1400 bp bant veren jel görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.7.). Elde edilen direkt-PCR ürünlerinden spesifik olan kısmın çoğaltılması için R16F2n/R16R2 primerleri kullanılarak nested-PCR işlemi gerçekleştirilmiş ve 1250 bp bant veren jel görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.7. ve 4.8.). Jel görüntüleri sayesinde bitkilerin fitoplazma ile bulaşık olduğu yönünden pozitif bantlar görülmüştür.



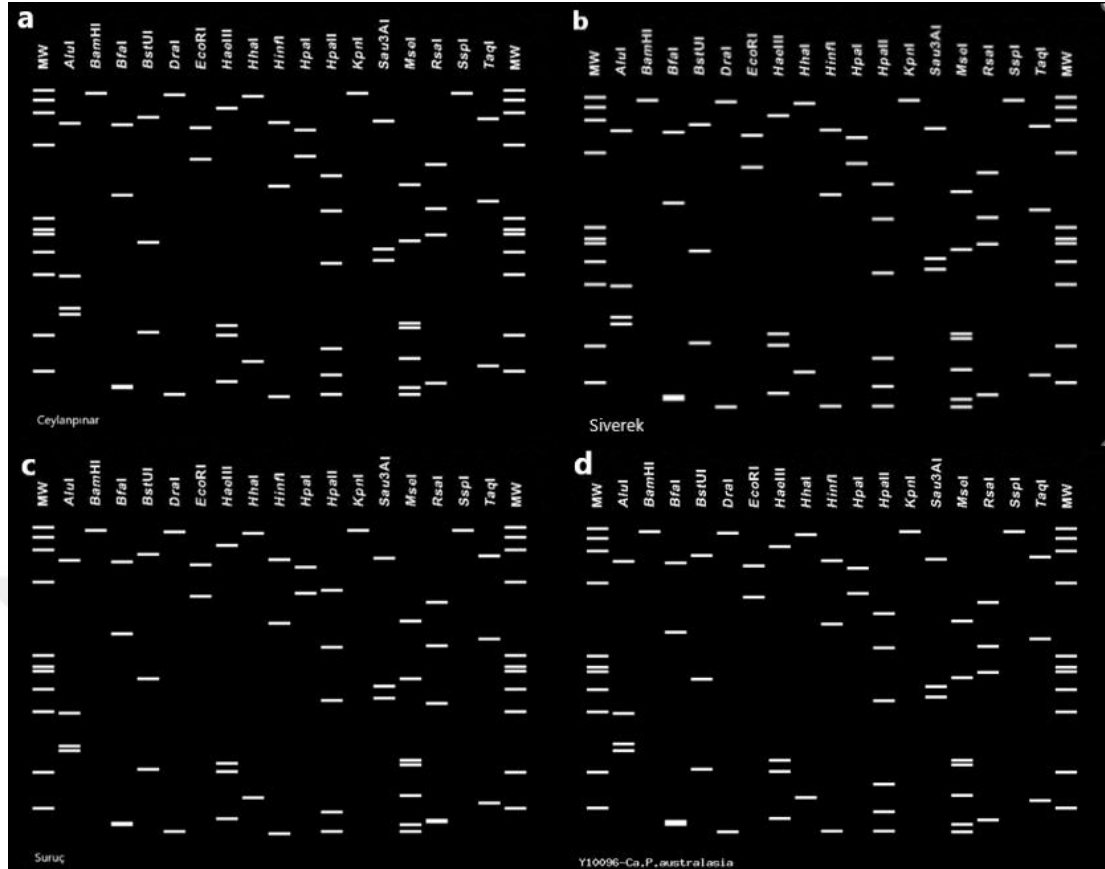
Şekil 4.7. Direk-PCR ve nested-PCR sonrasında yonca bitkilerinin jel elektroforez görüntüleri: 1. kuyucukta marker, 2-6. kuyucuklarda Ceylanpınar'dan alınan infekteli yonca bitkileri, 7-9. kuyucuklarda Siverek'ten alınan infekteli yonca bitkileri, 10-12. kuyucuklarda Suruç'tan alınan infekteli yonca bitkileri, 13. kuyucukta sağlıklı yonca bitkisi (simptomsuz), 14. pozitif kontrol (fitoplazma tanılanması için spesifik olan 1.400 bp ve 1250 bp üreten kaktüs) ve 15. negatif kontrol (ddH₂O) (%1 agaroz jel)



Şekil 4.8. Direk-PCR ve nested-PCR sonrasında yabancı otların jel elektroforez görüntüleri: 1. kuyucukta marker, 2. kuyucukta *Orobanchaceae*, 3. kuyucukta *Lolium perenne*, 4. kuyucukta *Sonchus asper*, 5. kuyucukta *Convolvulus arvensis* 6. *Cuscuta*, 7. pozitif kontrol (fitoplazma tanılanması için spesifik olan 1.400 bp ve 1250 bp üreten kaktüs) ve 8. sağlıklı yonca bitkisi (simptomsuz) (%1 agaroz jel)

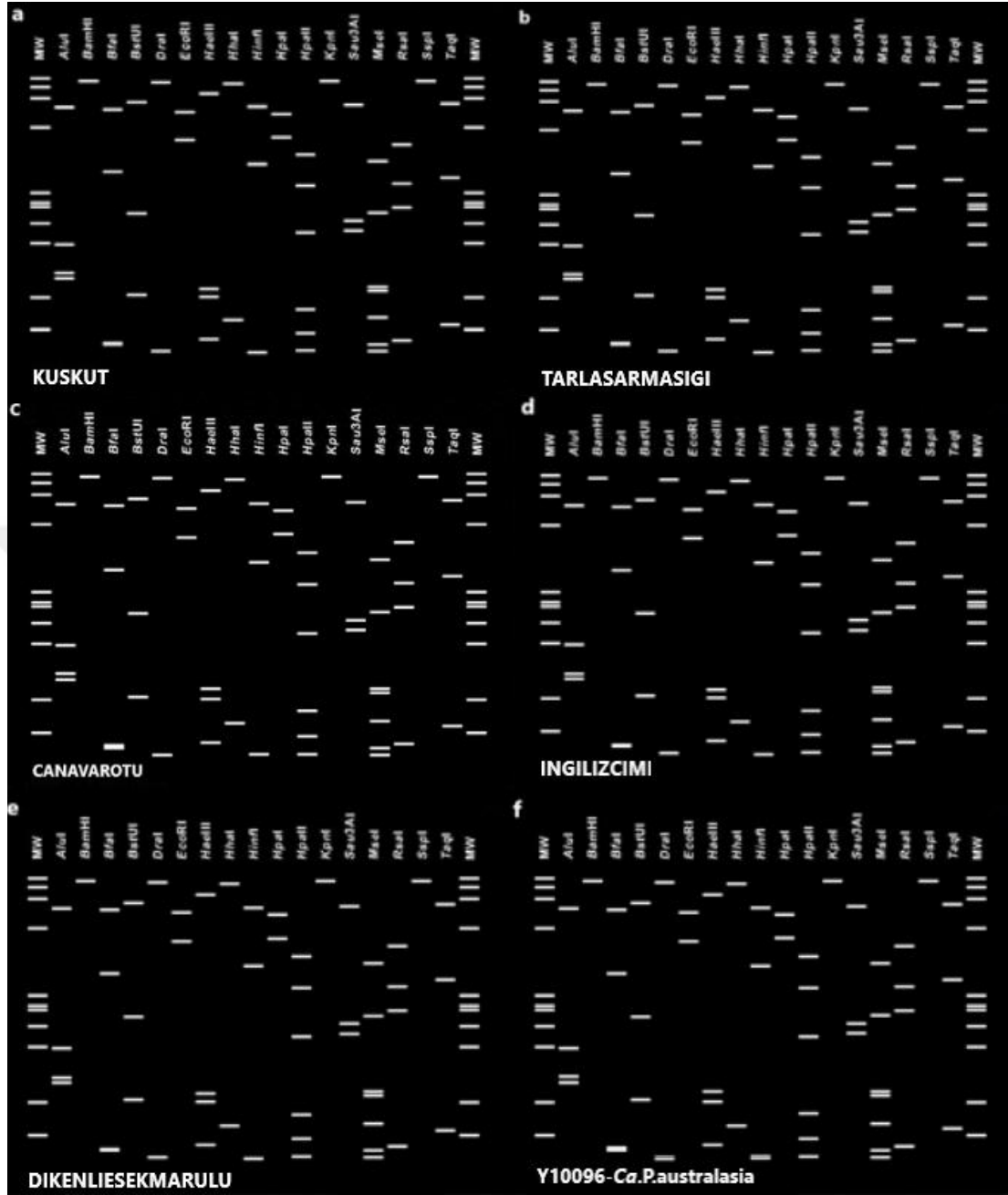
Çalışmada R16F2n/R16R2 primerleri kullanılarak elde edilen ürünler DNA dizilemesine gönderilmiştir. Dizilemeden gelen iki yönlü diziler MEGAX programı kullanılarak tek bir dizi haline getirilmiştir. Oluşturulan sekans dizilerinin hangi grup/alt grup içerisinde (16Sr ribozomal gen bölgesi baz alınarak) yer aldığı belirlenmesi için *iPhyClassifier* programı kullanılmıştır. Tüm zamanları ve son güncel çalışmaları da barındıran bu program sayesinde güvenilir *in silico* jel görüntüleri elde edilerek fitoplazmaların gruplandırılması sağlanmıştır (Alsaheli ve ark., 2020; Porotikova ve ark., 2020). *iPhyClassifier* programı kullanılarak 17 farklı restriksiyon enzimi ile karşılaştırılmış ve grup/alt grup teşhisi yapılmıştır.

iPhyClassifier programı sayesinde elde edilen *in silico* jel görüntüleri Şekil 4.9. sonucunda pozitif sonuç veren tüm yonca bitkilerinin tamamının ‘*Candidatus* Phytoplasma australasia’ (16SrII-D) grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Fitoplazma ile bulaşık olduğu belirlenen ve dizileme işlemleri sonucunda elde edilen tüm sekans dizilerin birbirleri ile homojenlik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Ceylanpınar, Siverek, Suruç ilçeleri yonca tarlalarından alınan ve infekteli olduğu belirlenen bitkilerin *iPhyClassifier* programı kullanılarak *in silico* jel görüntüleri elde edilmiştir. a) Ceylanpınar; b) Siverek, c) Suruç ve d) *Ca. P. australasia* (sınıflandırmada kullanılan kayıtlı izolat)

Ayrıca pozitif sonuç veren tüm yabancı otlardan elde edilen diziler kullanılarak *iPhyClassifier* programı sayesinde *in silico* jel görüntüleri oluşturulmuştur (Şekil 4.10.). Tüm yabancı otların '*Candidatus Phytoplasma australasia*' (16SrII-D) alt grubuna ile ilişkili olduğu, belirlenmiştir. Fitoplazma ile bulaşık olduğu belirlenen yabancı otların her bir türü için elde edilen sekans dizilerinin her biri kendi içerisinde %100 homojenlik göstermiştir. Bu nedenle çalışma her bir yabancı ot türü için tek bir dizi üzerinden yürütülmüştür.

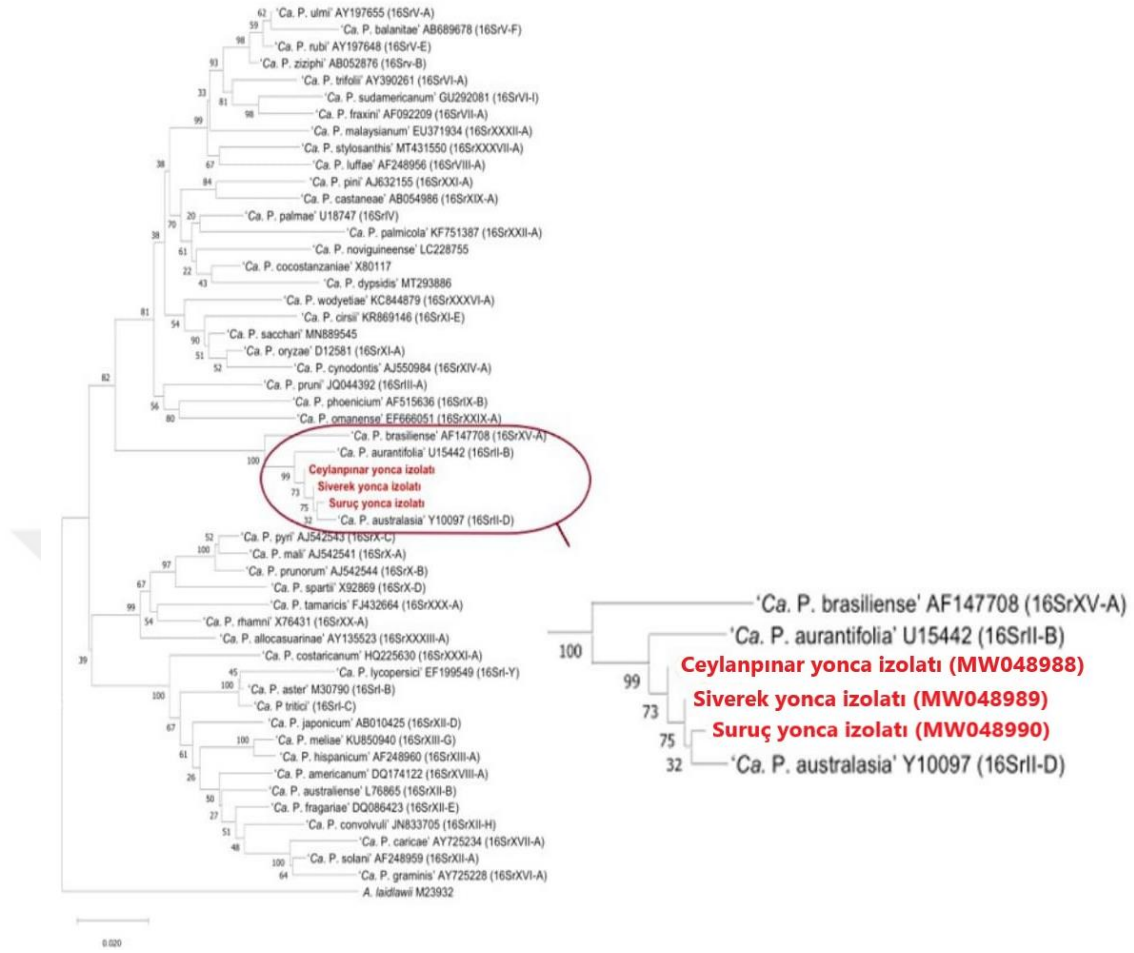


Şekil 4.10. Ceylanpınar, Siverek, Suruç ilçeleri yonca tarlalarından toplanan yabancı otlardan bulaşık oldu belirlenen bitkilerin *iPhyClassifier* programı kullanılarak in silico jel görüntüleri elde edilmiştir. a) kusküt; b) tarla sarmaşığı; c) canavarotu; d) İngiliz çimi; e) dikenli eşek marulu ve f) *Ca. P. australasia* (sınıflandırmada kullanılan kayıtlı izolat)

4.6. Filogenetik Analizleri

Filogenetik analiz; fitoplazma etmeninin diğer gruplar/alt grup arasındaki evrimsel benzerliklerinin ve akrabalık derecelerinin belirlenmesi için yapılmaktadır. Elde edilen sekanslar üzerinden yürütülen bu çalışmanın temel prensibi, dizilerin mevcut homolog yapıları göz önüne alınarak oluşturulan sınıflandırmadır. Öncelikle

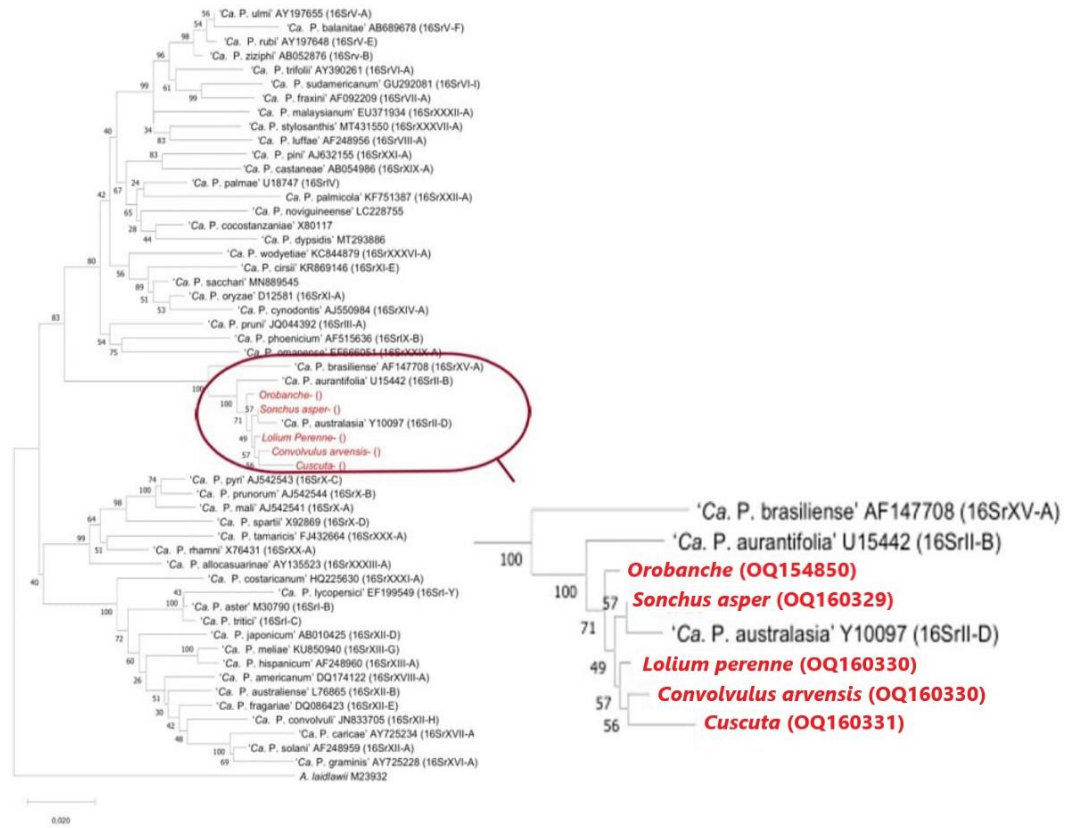
yonca bitkilerinin PCR ürünleri sonucunda elde edilen iki yönlü (forward-revers) diziler tek bir sekans haline getirilmiş ve *iPhyClassifier* programı ile etmenin '*Candidatus Phytoplasma australasia*' (16SrII-D) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatların 16SrDNA bölgesi üzerinden homolojik olarak %100 benzerlik göstermesi nedeniyle her ilçeden temsilci birer izolat seçilmiştir. Seçilen bu izolatlar NCBI üzerinden BLAST işlemine tabi tutulmuş ve bunun sonucunda '*Candidatus Phytoplasma australasia*' (16SrII-D) ile %99.92 oranında ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ardından sekanslar NCBI üzerinden GenBank'a yüklenerek kaydedilmiş ve erişim numaraları (Erişim numaraları: MW048988, MW048989, MW048990) oluşturulmuştur. Kayıt altına alınan diziler MEGAX programı kullanılarak var olan 49 fitoplazma grupları/alt grupları ile akrabalık düzeyleri karşılaştırılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.11.). Filogenetik ağacı oluştururken neighbor-joining yöntemi (bootstrap 1000) ve maximum likelihood istatistik yöntem kullanılmıştır.



Şekil 4.11. Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde pozitif olduğu belirlenen yonca bitkileri 49 gruplar/alt grupları ile karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaç

Diğer yandan yabancı otların PCR ürünleri sonucunda elde edilen iki yönlü (forward-revers) dizilerde tek bir sekans haline getirilmiş ve *iPhyClassifier* programı ile tüm yabancı otlardaki etmenin '*Candidatus Phytoplasma australasia*' (16SrII-D) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde her bir yabancı ottan elde edilen izolatlar kendi aralarında tamamen 16SrDNA bölgesi üzerinden homolojik olarak %100 benzerlik göstermiştir. Bu nedenle her bir tür için temsilci bir izolat seçilmiştir. Seçilen bu izolatlar NCBI üzerinden BLAST işlemine tabi tutulmuş ve bunun sonucunda sırasıyla; *Sonchus asper* (Dikenli eşek marulu) %98.7, *Convolvulus arvensis* (Tarla sarmaşığı) %98.7, *Cuscuta* spp. (Küsküt) %98.7, *Orobanche* (Canavar otu) %98.6 oranında ve *Lolium Perenne* (İngiliz çimi) %98.7 oranında '*Candidatus Phytoplasma australasia*' (16SrII-D) ile ilişkili oldukları belirlenmiştir. Devamında sekanslar NCBI üzerinden GenBank'a yüklenerek kaydedilmiş ve erişim numaraları (Erişim

numaraları: OQ160329, OQ154849, OQ160331, OQ154850, OQ160330) oluşturulmuştur. Kayıt altına alınan diziler MEGAX programı kullanılarak 49 fitoplazma grupları/alt grupları ile akrabalık düzeyleri karşılaştırılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.12.). Filogenetik ağacı oluştururken neighbor-joining yöntemi (bootstrap 1000) ve maximum likelihood istatistik yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 4.12. Yonca tarlalarından toplanan ve pozitif olduğu belirlenen yabancı otların 49 gruplar/alt grupları ile karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaç

4.7. Küsküt Bitkilerinde Fitoplazmanın Teşhisi

Küsküt (*Cuscuta* spp.) Cuscutaceae familyasına ait tam parazitik bir bitkidir (Davis, 1978). Yapraksız, ipliksi formada ve sarılıcı yapıya sahip olan bu bitki, konukçusunu bulur bulmaz tutunur ve yaşamını sürdürmeye başlar. Konukçunun floem ve ksilem ile bağlantı kurar (Kaya ve ark., 2018). Bu sayede yaşamı için gerekli olan su ve besin maddelerini (organik ve inorganik) alır (Kaya ve ark., 2018). Fitoplazmanın bitki floeminde yer almaları ve bu sayede küskütünde floem ile

bağlanarak gerek duyduğu besin maddelerini bünyesine almaları esnasında fitoplazmalara ait hücreleri de bünyelerine dahil etmeleri nedeniyle taşıyıcı görev üstlenirler. Bu özellikleri nedeniyle fitoplazmaların bir bitkiden diğer bir bitkiye taşınmaları için taşıyıcı bir köprü görevi üstlenirler. Daha önceki birçok araştırmada küskütün fitoplazmaları taşıyıcı görevini üstlendiği rapor edilmiştir.

Çalışmamızda tarla şartlarında mevcut bulunan küskütler incelenmiş ve bunun sonucunda toplanan 3 küsküt bitkisinin fitoplazma ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Diğer yandan tarlada fitoplazma simptomsu gösteren yonca ve tarla sarmaşığı arasında küskütün oluşturduğu bir köprü gözlemlenmiştir (Şekil 4.13.).



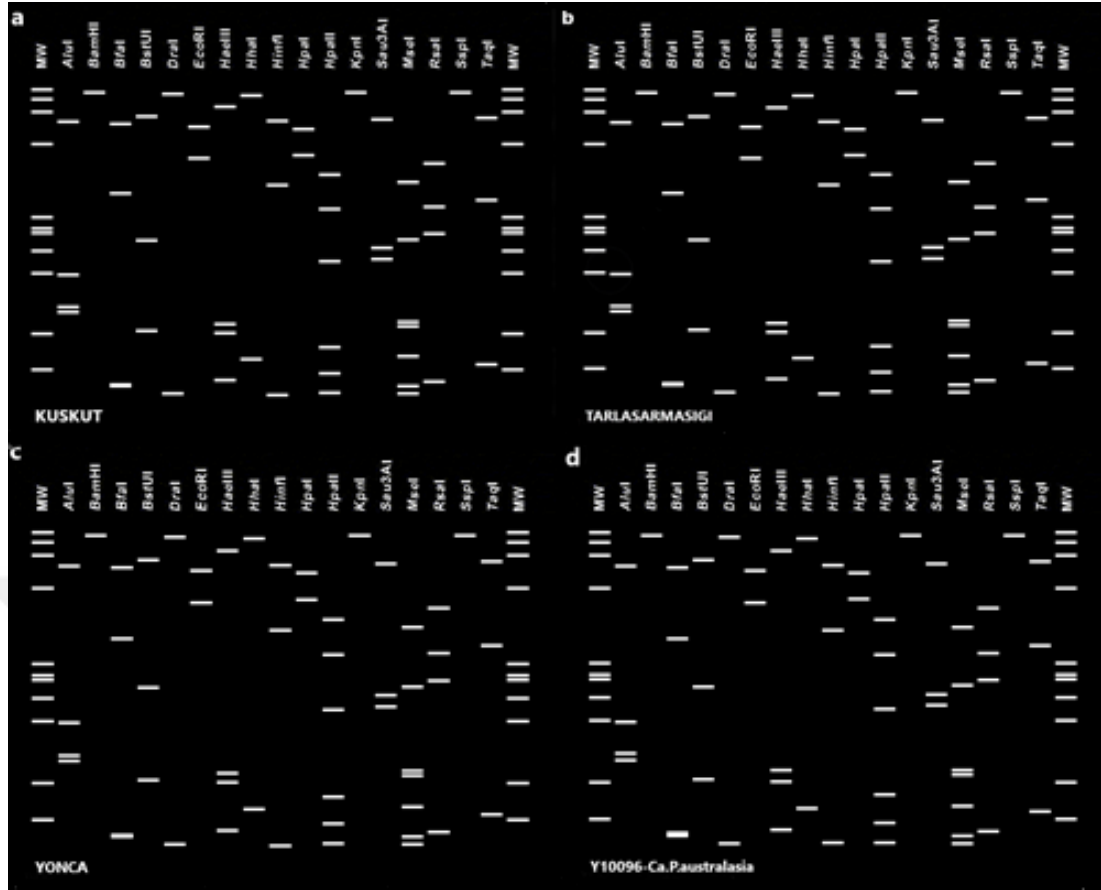
Şekil 4.13. Tarlada yonca-tarla sarmaşığı arasında kurulan küsküt köprüsü

Yonca bitkisi, tarla sarmaşığı ve küsküt üzerinde yapılan moleküler analizler sonucunda bu bitkilerin fitoplazma etmeni ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Etmenlerin hangi grup ve alt gruba ait olduklarının belirlenmesi için PCR ürünlerinin dizileme çalışmaları yapılmış ve elde edilen sekans dizileri *iPhyClassifier* programı kullanılarak yonca bitkisinin %98.7, tarla sarmaşığının %98.7 ve küskütün %97.5

oranında ‘*Candidatus Phytoplasma australasia*’ (16SrII-D) ile ilişkili oldukları belirlenmiştir. Elde edilen sekans dizileri NCBI yüklenerek yonca: MW048988, tarla sarmaşığı: OQ154849 ve kusküt: OQ160331 erişim numaraları ile kayıt altına alınmıştır.

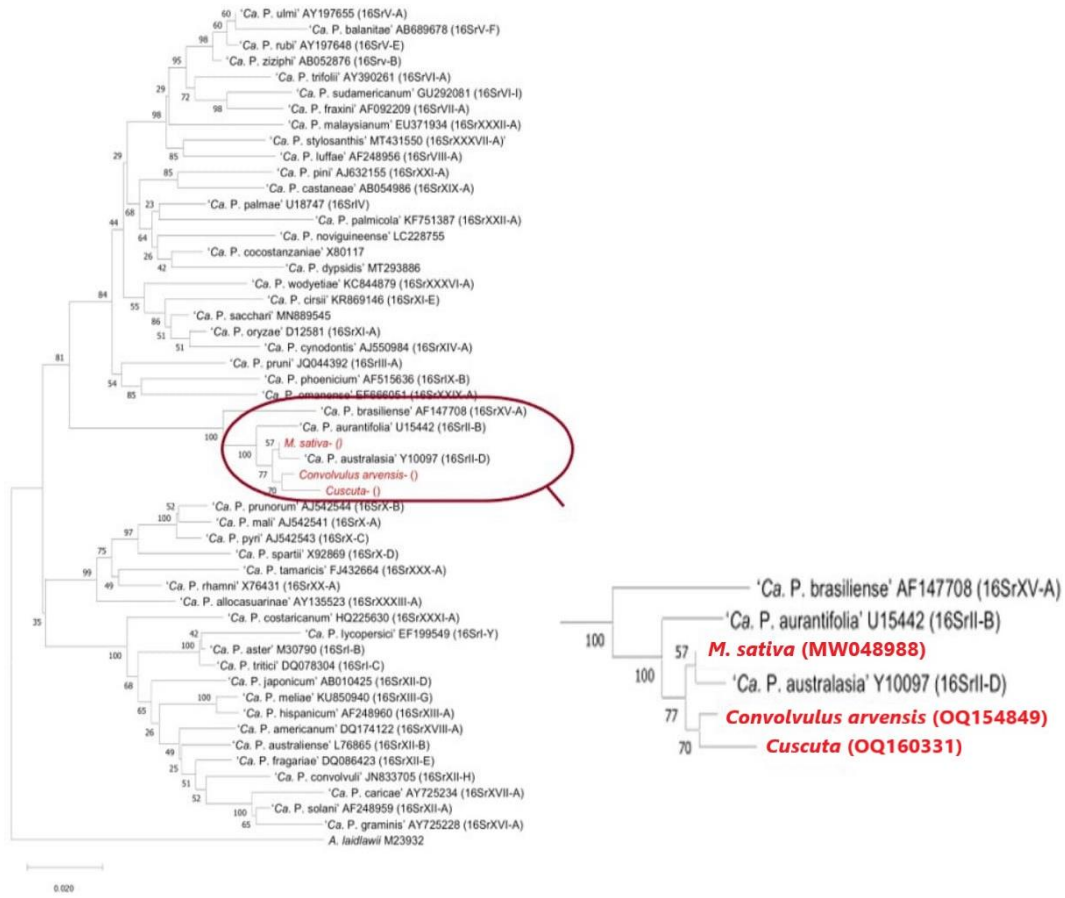
Diziler *iPhyClassifier* programı sayesinde *in silico* jel görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.14.). Fitoplazma ile bulaşık olduğu belirlenen yonca bitkilerinin, tarla sarmaşıklarının ve kuskütlerin dizileme işlemleri sonucunda elde edilen tüm sekans dizilerinin birbirleri ile homojenlik gösterdiği belirlenmiştir.





Şekil 4.14. Ceylanpınar ilçesi yonca tarlasında bulunan yonca-tarla sarmaşığı-küsküt bitkilerinin fitoplazma ile bulaşık oldu belirlenmiş ve rPhyClassifier programı kullanılarak elde edilen sekans dizileri üzerinden in silico jel görüntüleri elde edilmiştir. a) küsküt; b) tarla sarmaşığı; c) yonca ve d) *Ca. P. australasia* (sınıflandırmada kullanılan kayıtlı izolat)

Ardından MEGAX programı kullanılarak 49 fitoplazma grupları/alt grupları ile akrabalık ilişkileri karşılaştırılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.15.). Filogenetik ağacı oluştururken neighbor-joining yöntemi (bootstrap 1000) ve maximum likelihood istatistik yöntemi kullanılmıştır.

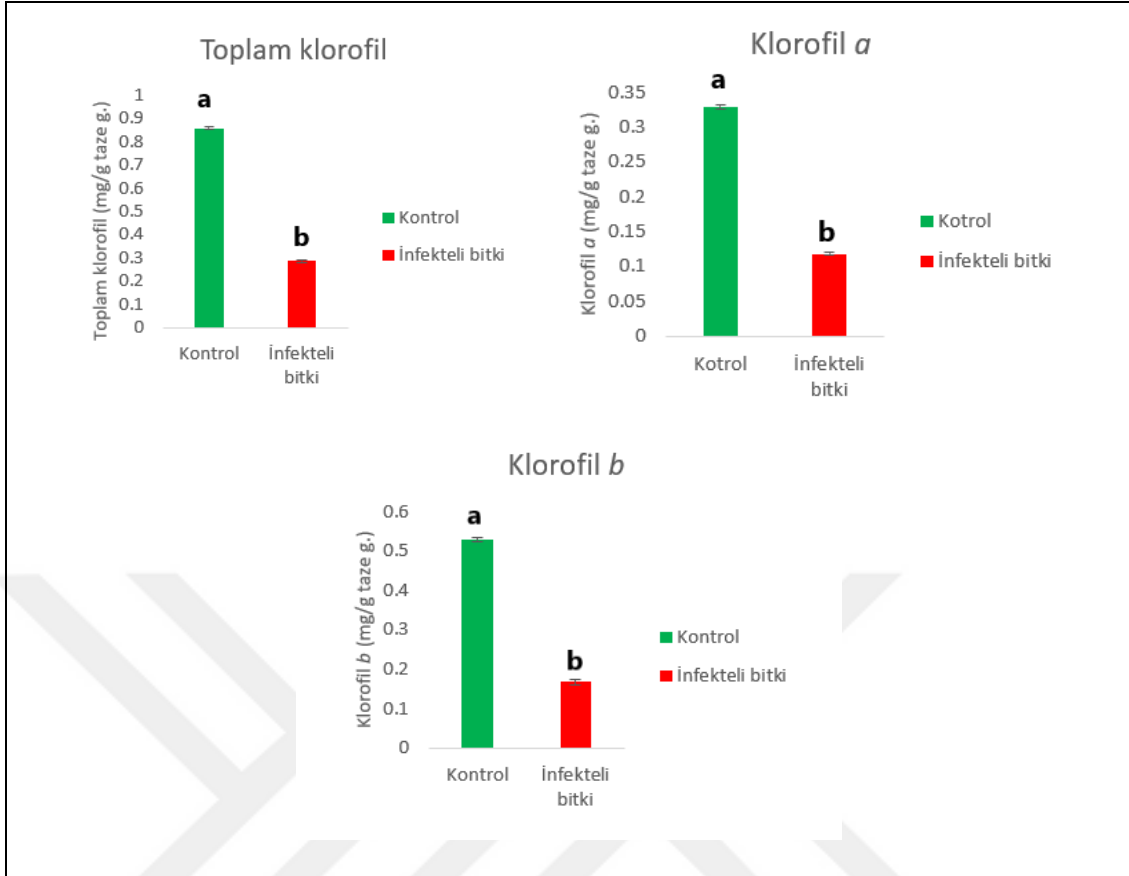


Şekil 4.15. Yonca, tarla sarmaşığı ve kusküt bitkilerinde mevcut bulunan fitoplazma etmeninin hem aralarında hemde 49 gruplar/alt grupları ile karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaç

4.8. Fitoplazma ile Bulaşık Yonca Bitkilerinde Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler

4.8.1. Klorofil içeriğinin belirlenmesi

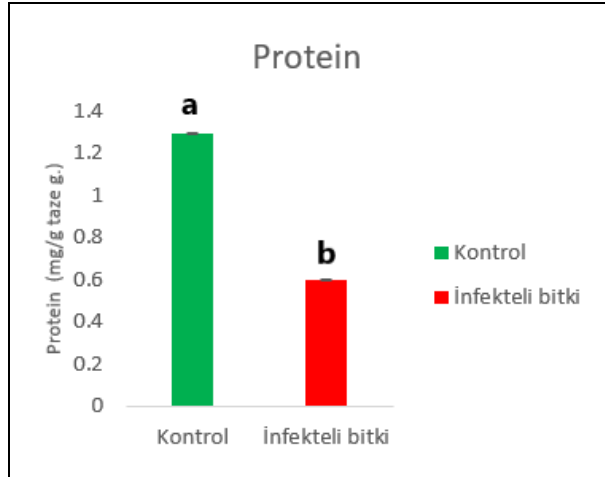
Klorofil ölçümleri sonucunda ‘*Ca. Phytoplasma australasia*’ ile infekteli ve sağlıklı yonca bitkilerinin klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriği Şekil 4.16’de gösterilmiştir. İnfekteli yonca bitkisinin klorofil içeriğinin sağlıklı yonca bitkileriyle kıyasla önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir. Bu değişikliğin arkasındaki ana mekanizmalardan biri muhtemelen patojenin klorofil yoluna (fotosistem I, fotosistem II, Mg^{2+} ve Fe^{2+} , nın tıkanması) müdahalesi olarak açıklanabilir (Xue ve ark., 2018; Buoso ve ark., 2019; Raiesi ve Golmohammadi, 2020).



Şekil 4.16. Sağlıklı ve infekteli bitkilerin klorofil (toplam, a ve b) içerikleri

4.8.2. Protein içeriğinin belirlenmesi

Patojenlerin bitkilerin fotosentetik aktivite üzerinde oluşturduğu değişikliklerden biri de protein içeriğinde meydana getirdiği azalmalardır (Bertamini ve ark., 2004). Çalışmada '*Ca. Phytoplasma australasia*' ile infekteli bitkilerin protein içeriğinin sağlıklı bitkilerinden düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17.). Böylece patojenlerin bitkilerin fotosentetik aktivite ve fotosentez üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu ve bunun sonucunda protein sentezinin olumsuz etkilendiği oldukça açıktır (Boex-Fontvieille ve ark., 2013). Protein sentezi enerji gradyanına bağlı olduğundan (Protein ve alt birimlerinin sentezi için) klorofil miktarının (toplam, a ve b) oldukça azaldığı görünmüş ve bunun protein içeriğine yansıdığı belirlenmiştir. Örneğin; Bertamini ve ark. (2003) fitoplazma enfeksiyonunun fotosistem II üzerinde önemli bir enfeksiyona neden olduğunu bildirmiştir. Fotosistem II'deki bu azalma, büyük olasılıkla klorofil ve light-harvesting klorofil-protein II komplekslerinin içeriğindeki azalmadan kaynaklandığı bildirilmiştir (Arce-Leal ve ark., 2020).

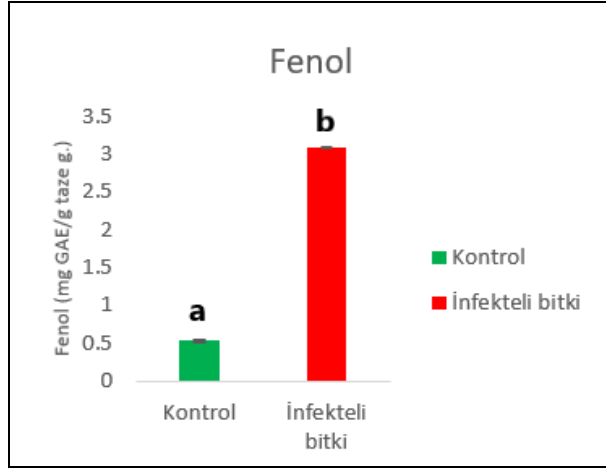


Şekil 4.17. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde protein içeriği

Ayrıca farklı streslerle karşılaşan bitkilerin protein ekspresiyon seviyelerindeki azalmalar, savunma mekanizmasının oluşturduğu bir yanıt olduğu bildirilmiştir (Janmohammadi ve ark., 2015). Yonca bitkisi hayvan yemi olarak tüketildiğinden, protein seviyelerindeki azalmalar çok önemlidir. Bu nedenle; fitoplazmaların protein sentezini azalttığı ve bunun sonucunda yonca tarlalarında fitoplazma etmeninin yaygınlığının ürün verimliliğini azaltabileceğini belirtmek önemlidir.

4.8.3. Fenol içeriğinin belirlenmesi

Fenolik içerikler, bitki savunma sistemlerinde bazı yapısal polimerlere yol açarlar. Ayrıca savunma genlerini tetiklemek için sinyal molekülleri olarakta önemli rol oynarlar (Jayaraj ve ark., 2010; Singh ve ark., 2014; Tuladhar ve ark., 2021). Çalışmada '*Ca. Phytoplasma australasia*' ile infekteli bitkilerin fenol içeriğinin sağlıklı bitkilerinden yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18.).

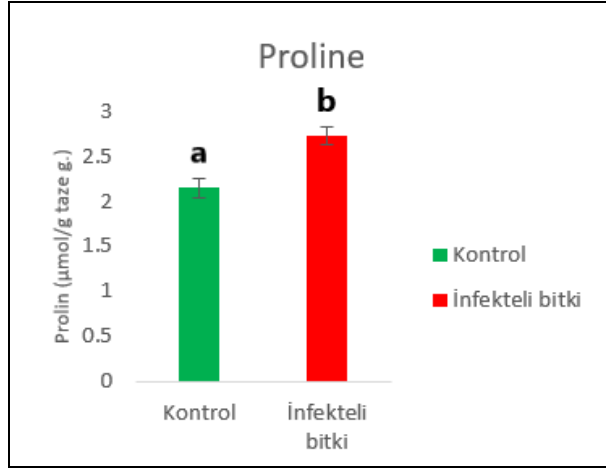


Şekil 4.18. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde fenol içeriği

'*Ca. Phytoplasma australasia*' etmeninin stres metabolitleri üzerinde meydana getirdiği artışlar bitkinin metabolizması için önemli bir tehdittir. Stresle ilişkili bu metabolitler; ozmotik potansiyelin düzenlenmesine ve savunma sistemi içerisinde antimikrobiyal kapasiteni artırarak savunma stratejilerin oluşturulmasında rol oynarlar. Örneğin; yüksek miktardaki fenol ve fenolik birleşikler, mikrobiyal kapasitesini artırarak bitki direncini artırır ve saldırıya geçen patojenin yayılmasının miktarını ve hızını azaltır (Kubalt, 2016; Rasouli ve ark., 2016). Benzer bir çalışma halofit bitkiler üzerinde yapılmıştır. Bu bitkilerin yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin fenolik savunma ile ilişkili molekülerin biyosentezini farklı alanlarında kullanılabilen biyoaktif moleküllere dönüştürdüğünü belirlemişlerdir (Lopes ve ark., 2021).

4.8.4. Prolin içeriğinin belirlenmesi

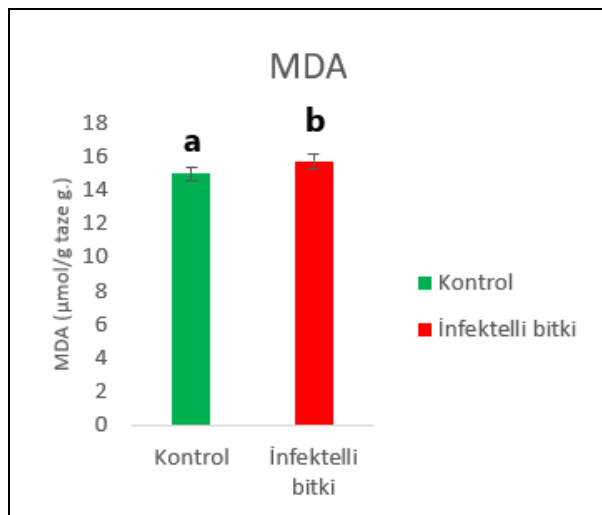
Stres koşulları altında suda çözünen bir amino asit olan prolin birikimi, bitkinin dayanıklılığının göstergesidir (Naliwayski ve Sklodowska, 2021). Yüksek konsantrasyonlarda hücre yapısına zarar vermesede hücrenin ozmotik potansiyelini düşürür (Naliwayski ve Sklodowska, 2021). Bu özelliği sayesinde bitkilerin savunma sistemleri için bir bilgi kaynağıdır. Çalışmada '*Ca. Phytoplasma australasia*' ile infekteli bitkilerin prolin içeriğinin sağlıklı bitkilerinden oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde prolin içeriği

4.8.5. Lipit peroksidaz aktivitesinin (MDA) belirlenmesi

MDA birikimi, bitkinin stres altında olup olmadığının belirlenmesi için iyi bir işaretir. MDA miktarı, stresin şiddetini ve bitkilerin strese karşı direncini gösterir (Yasmin ve ark., 2021). He ve ark. (2018) membran hasarı, reaktif oksijen türleri (ROS) hasarı, protein denatürasyonu ve protein oksidasyonunun yanı sıra ozmotik stresin abiyotik stresi takiben MDA'nın artmasıyla uyumlu olduğunu bildirmiştir. Çalışmada '*Ca. Phytoplasma australasia*' ile infekteli bitkilerin MDA içeriğinin sağlıklı bitkilerinden oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20.).

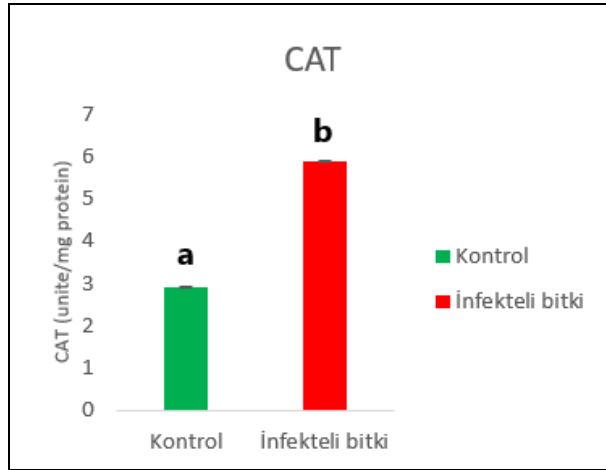


Şekil 4.20. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde MDA içeriği

Fitoplazma etmeni vasküler sistem içerisinde yer almaktadır. Bu bilgiler ışığında vasküler sistem içerisinde sıkıca kurulmuş fitoplazmaların, stres altındaki bitkilerde hücre içi ve dışı ozmotik uyumsuzluklara neden olarak iyonik dengesizlikler yaratabilir (Ghoulam ve ark., 2002; Bernardo ve ark., 2019). Bu dengesizlik, lipidlerin ve proteinlerin sentezi için ilgili enzim seviyesini değiştirebilir (Hong ve ark., 2016; Rawat ve ark., 2020). Sonuç olarak geçirgenlik ve protein oksidasyonu artar (Niu ve Xiang, 2018).

4.8.6. CAT (E.C.1.11.1.6, CAT) aktivitesinin belirlenmesi

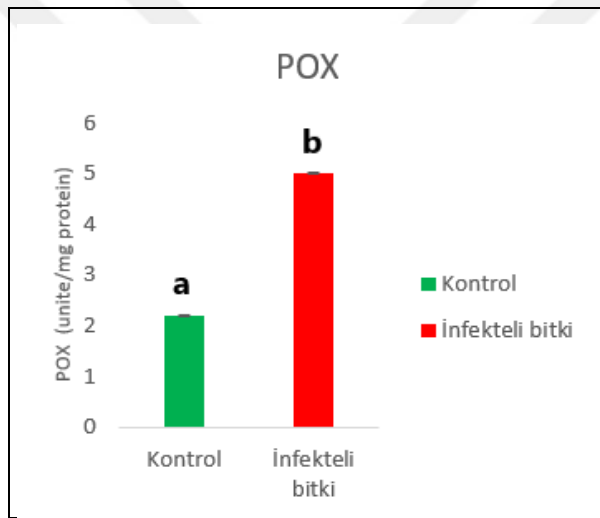
CAT enzimi, hücrelerde H_2O_2 azaltan veya parçalayan antioksidan enzimlerden biridir (Ahmad ve ark., 2021). Çalışmada '*Ca. Phytoplasma australasia*' ile infekteli bitkilerin CAT içeriğinin sağlıklı bitkilerinden oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21.). CAT aktivitesindeki artış, bitkide patojenin neden olduğu strese karşı direnci arttırdığı, böylece bitkinin düşük H_2O_2 konsantrasyonlarını korumayı sağladığını belirtilmiştir (Magbanua ve ark., 2007; Kim ve ark., 2020; Pan ve ark., 2020).



Şekil 4.21. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde CAT içeriği

4.8.7. POX (E.C.1.11.1.7, POX) aktivitesinin belirlenmesi

POX enzimi, çeşitli savunma mekanizmalarına katılarak patojenlere karşı hızlı savunma sağlayan en önemli antioksidan enzimlerden biridir (Salari ve ark., 2012; Siddique ve ark., 2014). Çalışmada '*Ca. Phytoplasma australasia*' ile infekteli bitkilerin POX içeriğinin sağlıklı bitkilerinden oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.22.). Peroksidaz aktivitesi, bitki hücre duvarının lignifikasyonunu ve çapraz bağlanmasını artırarak patojenin yayılmasını sınırlayan ROS üretiminde rol oynar (Patel ve ark., 2011). Ayrıca, peroksidaz aktivitesinin suberizasyon veya yara iyileşmesinde önemli rolü vardır (Yang ve ark., 2020).

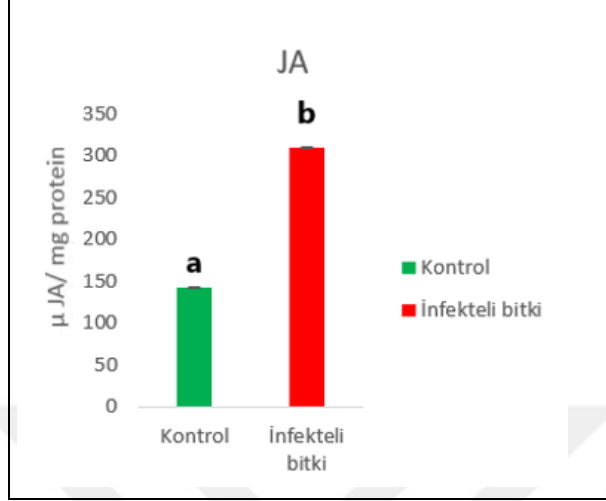


Şekil 4.22. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde POX içeriği

4.8.8. Jasmonik asit (JA)

Jasmonik asit (JA) ve türevleri (JAs) biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki savunması için düzenleyiciler olarak kabul edilir (Pieterce ve ark., 2012; Raza ve ark., 2021; Sharma ve Gayen, 2021). Yaralanma, vektör ve patojen saldırılarına karşı savunma yanıtlarının tetiklenmesi için önemli bir sinyal molekülüdür (Rosahl ve Feussner, 2004; Costarelli ve ark., 2020). Bu özellikleri nedeniyle bitki bünyesinde mevcut olan JA miktarı bizlere bitkinin patojenlere karşı oluşturduğu savunma mekanizması hakkında önemli bilgiler sağlar. '*Ca. Phytoplasma australasia*' ile

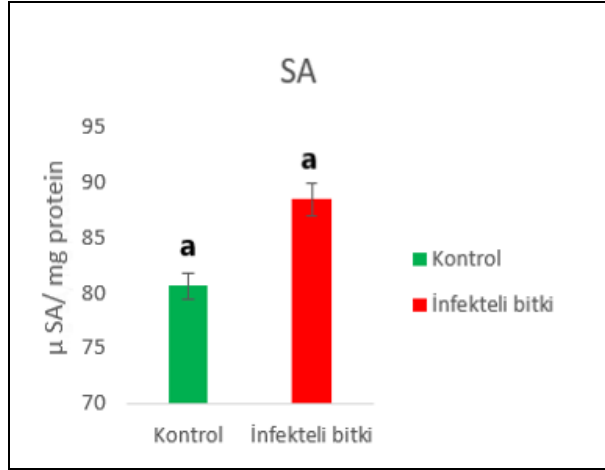
infekteli bitkilerin JA miktarının sağlıklı bitkilerinden oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23.), $P \leq 0.05$.



Şekil 4.23. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde JA içeriği

4.8.9. Salisilik asit (SA)

Bir diğer bitki savunma düzenleyicisi ise salisilik asit (SA) hormonudur (Pieterce ve ark., 2012; Raza ve ark., 2021; Sharma ve Gayen, 2021). Salisilik asit (SA) fotosentez, terleme, iyon alınımı ve taşınmasında önemli rol oynayan fenolik bir fitohormondur (Matilla-Vazquez ve Matilla 2014; de Freitas ve ark., 2019). Ayrıca yaprak anatomisini ve kloroplast yapısını düzenler (Warrier ve ark., 2013; Poor ve ark., 2019). Çalışmamızda '*Ca. Phytoplasma australasia*' ile infekteli bitkilerin SA miktarının sağlıklı bitkilerinden yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.24.), $P \leq 0.05$.



Şekil 4.24. Sağlıklı ve infekteli bitkilerde SA içeriği

4.9. İstatiksel Analiz Sonuçları

Fitoplazma ile infekteli ve sağlıklı bitkilerin biyokimyasal analizlerinden sonra hastalık yolunun mekanizmalarını daha iyi anlayabilmek korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Korelasyon sayede olasılık kuramı ve istatistiksel iki parametre arasındaki doğrusal ilişkinin yönünü ve gücünü belirledik. Parametreler arasında ilişkilerin rahat bir şekilde anlaşılabilmesi için +/- işaretlerle sMBOLIZE edilmiştir (Windows verisyon 20.1 yazılımı (Minitab Inc., State College, PA, USA) kullanılmıştır) (Şekil 4.25.). Hastalık sonrasında sentezlenen prolin, MDA, JA, SA, POX, CAT, fenol gibi stres metabolikleri kendi aralarında pozitif ilişki gösterirken, toplam klorofil ve protein ile negatif ilişki göstermiştir. Bitkiler hücre yapısını birlik tutmak ve vejetatif-generatif aşamaları gerçekleştirebilmeleri için simptomları dikkate değer bir seviyeye indirmek için proteinleri kullandığı tespit edilebilir (Staswick, 1994). Stresle ilişkili tüm metabolitlerin ortak bir yol izlediği açıktır. Bu nedenle fotosentetik etkinliği ve protein seviyelerini iyileştirmek, yeni dirençli yonca hatları üretilmesinde bize yardımcı olacaktır. Ayrıca, biyotik stres faktörlerinden önemli ölçüde farklı olarak diğer stres yollarını kullanan abiyotik stres faktörlerinin, biyotik ajanların bulaştığı bitkilerde çoğalmayı kısıtlayacağını ve sınırlayacağını unutmamalıyız (Dikilitas ve ark., 2020). Bu nedenler doğrultusunda çoklu direnç ve diğer metabolik yollar için genlerin taranması ileriki çalışmalar için büyük önem arz etmektedir.

	Toplam klorofil	Prolin	Protein	MDA	CAT	POX	JA	SA
Prolin	-							
Protein	+	-						
MDA	-	+	-					
CAT	-	+	-	+				
POX	-	+	-	+	+			
JA	-	+	-	+	+	+		
SA	-	+	-	+	+	+	+	
Fenol	-	+	-	+	+	+	+	+

Şekil 4.25. Enfekte olmuş bitkide ölçülen biyokimyasal parametreler (toplam klorofil, prolin, protein, MDA, CAT, Pox, JA, SA ve fenol) arasındaki kolerasyon ilişkisi ($P \leq 0.05$ 'e dayalı LSD testi)

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Dünyanın diğer birçok ülkesine göre ülkemizde yem bitkileri yetiştiriciliği az sayıda alanda yapılmaktadır. Ancak hayvansal üretim pazarına bakıldığında yem bitkisi yetiştiriciliğinin ülkemiz için önemli olduğu ve yetiştiricilik alanlarının artırılmasının önem arz ettiği bir geçektir. Günümüzde var olan alanlara bakıldığında ise yonca yetiştiriciliğinin yapıldığı alanların ciddi bir kısmının Şanlıurfa ilinde yer aldığı bilinmektedir. Yetiştiriciliğin bu denli az olmasının yanı sıra üretimi etkileyen birçok biyotik ve abiyotik stres faktörleri mevcuttur. Özellikle de son yıllarda birçok bitkide hastalığa neden olan ve şiddetinin her yıl bir önceki yıla göre artıran fitoplazma etmenleri de yonca yetiştiriciliği yapılan tarlalarda görülmeye başlanmıştır. Şanlıurfa ilinin Ceylanpınar, Siverek ve Suruç ilçelerinde yer alan yonca tarlalarında görülen sararma, kızarıklık, küçük yaprak oluşumu, bodurluk ve cadı süpürgesi belirtileri gözlemlenmiş ve yapılan moleküler çalışmalar sonucunda toplanan tüm yonca örneklerinin '*Ca. phytoplasma australasia*' ile infekteli oldukları belirlenmiştir.

'*Ca. phytoplasma australasia*' ile infekteli yonca bitkileri tarla koşullarında incelendiğinde şiddetli belirtilerin gösterdiği ve yaptığımız biyokimyasal analizler sonucunda bitki metabolizmalarını ciddi boyutlarda bozdukları saptanmıştır. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma '*Ca. phytoplasma australasia*' ile infekte olmuş yonca bitkilerindeki ilk biyokimyasal çalışmadır. Biyokimyasal parametreleri değerlendirdiğimizde MDA, prolin ve fenol gibi stres metabolitlerinde artış gözlemlenirken etmenin klorofil ve protein içeriğini düşürdüğü belirlenmiştir. '*Ca. phytoplasma australasia*'nın fotosentez aktivitesini ve protein sentezini düşürerek bitkinin enerji metabolizmasına müdahale ettiği açıktır. Aynı zamanda etmen ile mücadele edebilmeleri için bitki bünyesinde metabolitler üretmişlerdir. Üretmiş oldukları bu metabolitler sayesinde fitoplazma etmeninin bitki için oluşturduğu olumsuz etkileri en aza indirgenmesi sağlanmaktadır.

Antioksidan enzimlerinin artan aktiviteleri sayesinde bitki savunma sisteminin vejetatif dönem boyunca aktif olduğu bilinmektedir. Örneklem belirtilerinin

görüldüğü an itibarıyla yapılı ve etmenin varlığı bu şekilde belirlenir. Ancak savunma mekanizmasının aktif olması nedeniyle etmenin bitki içerisinde oluşturduğu belirtilerden önce varlığının kurulmuş olduğu bir gerçektir. Bu nedenler doğrultusunda savunma mekanizmasının üretim sezonu boyunca aktif olmasını öneriyoruz.

Ayrıca savunma genlerinin aktivasyonunda önemli rol oynayan JA ve SA içeriklerini incelenmiş. ‘*Ca. phytoplasma australasia*’ ile infekteli bitkilerde JA içeriğinin sağlıklı bitkilerden önemli ölçüde yüksek olduğu ortaya konmuştur. Ancak ‘*Ca. phytoplasma australasia*’ ile infekteli bitkide SA içeriğinin sağlıklı bitkilerden yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Diğer yandan yonca tarlaları içerisinde/kenarında bulunan yabancı otlardan toplanan örnekler fitoplazma açısından testlenmiştir. Yaptığımız bir dizi moleküler çalışma sonucunda *Sonchus asper* (Dikenli eşek marulu), *Convolvulus arvensis* (Tarla sarmaşığı), *Cuscuta* spp. (Küsküt), *Orobancha* (Canavar otu) ve *Lolium perenne* (İngiliz çimi) fitoplazma ile bulaşık oldukları ortaya konmuştur. Tüm pozitif yabancı otların yine ‘*Ca. phytoplasma australasia*’ ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Böylece yonca tarlaları içerisinde yer alan bu yabancı ot türlerinin etmenin ara konukçusu olabileceği ve yabancı ot mücadelesinin bu anlamda etkili bir şekilde planlanması gerekmektedir.

Fitoplazma enfeksiyonu sonrasında yonca bitkilerinde oldukça yüksek savunma tepkileri görülmüştür. Bununla birlikte iklim değişiklikleri ve çevre kirliliği nedeniyle yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, su stresi ve donma gibi abiyotik stres faktörleri ile virüs, bakteri veya fungus gibi biyotik ajanlar da fitoplazma ile etkileşime girebilir ve ciddi streslere neden olabilir. Bu sebepler doğrultusunda, abiyotik/biyotik stres ajanlarına karşı dirençli bitki üretimi çok önemlidir. Böylece yeni fitoplazmik ırklar için yonca tarlalarının gözlemlenmesi gerekmektedir. Ayrıca dirençli bitki üretiminde bir diğer önemli unsur ise var olan fitoplazmalar üzerinde herhangi bir modifikasyonun olup olmadığının belirlenmesi de önemlidir.

Bir diğerk önemli unsur ise taşıma şekillerinin belirlenmesidir. Fitoplazmaların taşınmasında vektörle ve tohumla taşıma çok önemlidir. Bu konularda daha kapsamlı çalışmaların yapılması ve mücadele şekillerini destekleyici verilerin oluşturulması önemlidir.

Gelecek yıllarda yonca bitkilerinin ‘*Ca. phytoplasma australasia*’ya karşı direncini ve olası etkileşimlerini izlemek için direnç genini/genlerini belirlemek gerekmektedir. Bu sayede ıslah çalışmalarının yapılması ve bu patojene karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesi sağlanmalıdır. Ayrıca gelecek yıllar içerisinde meydana gelebilecek modifikasyonlarında takibi önemlidir.

Fitoplazmalar ile kimyasal bir mücadelesinin olmaması nedeniyle kültürel mücadele yöntemlerinin iyi planlanması ve uygulanması gerekmektedir. Fitoplazmaların yonca tohumları ile taşındığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Khan ve ark. 2002). Bu nedenle hastalıktan arı olan tohumların kullanılması çok önemlidir. Ayrıca vektörle ve yabancı otlarla mücadelenin de iyi bir şekilde yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- ACAR, Z., TAN, M., AYAN, İ., ÖNAL AŞCI, Ö., MUT, H. BAŞARAN, U., GÜLÜMSER, E., CAN, M. ve KAYMAK, G. 2020. Türkiye’de yem bitkileri tarımının durumu ve geliştirme olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği IX. Teknik Kongresi, Cilt 1, Ankara, s.529.
- AHMAD, D. I. L. S. H. A. D., JAİN, S. K., JOSHI, M. A., ANAND, A., TOMAR, B. S., KUMAR, S. and HASAN, M. H. 2021. O₂ as a better index of seed quality and mechanism of cucumber (*Cucumis sativus*) seed deterioration. Indian Journal of Agricultural Sciences, 91: 1500-1504.
- 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(8): 828–832.
- AL-KUWAITI, N.; KAREEM, T.; SADAQ, F.H.; AL-AADHAMI, L.H. First report of phytoplasma detection on sand olive, cowpea and alfalfa in Iraq. J. Plant Prot. Res. 2019, 59: 428–431.
- AL-SAADY, N. A., KHAN, A. J., CALARI, A., AL-SUBHI, A. M. and BERTACCINI, A. 2008. “*Candidatus* Phytoplasma omanense”, associated with witches’-broom of *Cassia italica* (Mill.) Spreng. in Oman. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(2): 461–466.
- ALSAHELI, Z., CONTALDO, N., MEHLE, N., DERMASTIA, M., ELBEAINO, T., and BERTACCINI, A. 2020. First detection of “*Candidatus* Phytoplasma asteris” - and “*Candidatus* Phytoplasma solani”-related strains in fig trees. Journal of Phytopathology, 168(1): 63–71.
- AL-SALEH, M. A., AMER, M. A., AL-SHAHWAN, I. M., ABDALLA, O. A. and DAMIRI, B. V. 2014. Detection and Molecular Characterization of Alfalfa Witches'-Broom Phytoplasma and its Leafhopper Vector in Riyadh region of Saudi Arabia. International Journal of Agriculture and Biology, 16(2).
- AL-SUBHI, A. M., HOGENHOUT, S. A., AL-YAHYAI, R. A. and AL-SADI, A. M. 2018. Detection, identification, and molecular characterization of the 16SrII-D phytoplasmas infecting vegetable and field crops in Oman. Plant Disease, 102(3): 576-588.
- ANNIGERI, S., PANKAJ, SHAKIL, N. A., KUMAR, J. and SINGH, K. 2011. Effect of jasmonate (jasmonic acid) foliar spray on resistance in tomato infected with root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Annals of Plant Protection Sciences, 19: 446-450.
- ARCE-LEAL, Á. P., BAUTISTA, R., RODRIGUEZ-NEGRETE, E. A., MANZANILLA-RAMIREZ, M. Á., VELÁZQUEZ-MONREAL, J. J., SANTOS-CERVANTES, M. E., MÉNDEZ-LOZANO, J., BEUZÓN, C. R., BEJARANO, E. R., CASTILLO, A. G., CLAROS, M. G. and LEYVA-LÓPEZ, N. E. 2020. Gene expression profile of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) trees in response to Huanglongbing disease caused by *Candidatus* Liberibacter asiaticus. Microorganisms 8:528.
- ARNON, D. L. 1949. Copper enzyme is isolated chloroplast: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- AROCHA, Y., LÓPEZ, M., PIÑOL, B., FERNÁNDEZ, M., PICORNELL, B., ALMEIDA, R., PALENZUELA, I., WILSON, M. R. and JONES, P. 2005.

- “*Candidatus Phytoplasma graminis*” and “*Candidatus Phytoplasma caricae*”, 112 two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6): 2451–2463.
- AROCHA, Y., ANTESANA, O., MONTELLANO, E., FRANCO, P., PLATA, G. and JONES, P. 2007. “*Candidatus Phytoplasma lycopersici*”, a phytoplasma associated with “hoja de perejil” disease in Bolivia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8): 1704–1710.
- AYVACI, H., SIMSEK, E., AKKURAK, H., DIKILITAS, M. and GULDUR, M. E. 2021. First report of a ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’-related strain associated with Cactus witches’ broom disease in *Opuntia* sp. in Turkey. *New Disease Reports*, 44(1): e12031.
- BATES, L. S., WALDREN, R. P. and TEARE, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 39: 205-207.
- BERNARDO, L., CARLETTI, P., BADECK, F. W., RIZZA, F., MORCIA, C., GHIZZONI, R., ROUPHAEL, Y., COLLA, G., TERZI, V. and LUCINI, L. 2019. Metabolomic responses triggered by arbuscular mycorrhiza enhance tolerance to water stress in wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*. 137:203-212.
- BERTAMINI, M., MUTHUCHELIAN, K. and NEDUNCHEZHIAN, N. 2004. Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *J. Phytopathol.* 152:145-152.
- BERTACCINI, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673–689.
- BERTACCINI, A., AROCHA-ROSETE, Y., CONTALDO, N., DUDUK, B., FIORE, N., MONTANO, H. G., KUBE, M., KUO, C. H., MATRINI, M., OSHIMA, K., QUAGLINO, F., SCHNEIDER, B., WEI, W. and ZAMORANO, A. 2022. Revision of the ‘*Candidatus Phytoplasma*’ species description guidelines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(4), 005353.
- BERTAMINI, M., GRANDO, M. S. and NEDUNCHEZHIAN, N. 2003. Effects of phytoplasma infection on pigments, chlorophyllprotein complex and photosynthetic activities in field grown apple leaves. *Biol. Plant.* 46:237-242.
- BERTAMINI, M., MUTHUCHELIAN, K. AND NEDUNCHEZHIAN, N. 2004. Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *J. Phytopathol.* 152:145-152.
- BOEX-FONTVIEILLE, E., DAVENTURE, M., JOSSIER, M., ZIVY, M., HODGES, M. and TCHERKEZ, G. 2013. Photosynthetic control of Arabidopsis leaf cytoplasmic translation initiation by protein phosphorylation. *PLoS ONE* 8:e70692.
- BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248–254.
- BROWN, H. E. 2004. Understanding yield and water use of dryland forage crops in New Zealand. Doctoral dissertation, Lincoln University, New Zealand, pp.288.
- BUOSO, S., PAGLIARI, L., MUSETTI, R., MARTINI, M., MARRONI, F., SCHMIDT, W. and SANTI, S. 2019. ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’

- interferes with the distribution and uptake of iron in tomato. *BMC Genomics* 20:703.
- CHANG, C. J. 1977. Histological investigation on phyllody in *Catharanthus roseus* L (Doctoral dissertation, University of Missouri-Columbia).
- CONCÍ, L., MENEGUZZI, N., GALDEANO, E., TORRES, L., NOME, C. and NOME, S. 2005. Detection and molecular characterisation of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA ash yellows group (*Candidatus* Phytoplasma fraxini'). *European Journal of Plant Pathology*, 113(3), 255-265.
- COSTARELLI, A., BIANCHET, C., EDERLI, L., SALERNO, G., PIERSANTI, S., REBORA, M. and PASQUALINI, S. 2020. Salicylic acid induced by herbivore feeding antagonizes jasmonic acid mediated plant defenses against insect attack. *Plant Signaling & Behavior*, 15:1704517.
- CVIKOROVÁ, M., HRUBCOVÁ, M., VÄGNER, M., MACHÁČKOVÁ, I. AND EDER, J. 1994. Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment. *Physiol. Plant.* 91: 226-233.
- ÇAĞLAR, B. K. and ELBEAİNO, T. 2013. A novel phytoplasma associated with witches' broom disease of *Ligustrum ovalifolium* in Turkey. *European journal of plant pathology*, 137(1), 113-117.
- DAVIS, P. H. (1978). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 6: 682-683.
- DAVIS, R. E. and LEE, I. M. 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83(9): 1008–1011.
- DAVIS, R. E., DALLY, E. L., GUNDERSEN, D. E., LEE, I. M., and HABILI, N. 1997. "*Candidatus* phytoplasma australiense," a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2): 262–269.
- DAVIS, R. E., ZHAO, Y., DALLY, E. L., JOMANTIENE, R., LEE, M., WEI, W. and KITAJIMA, E. W. 2012. '*Candidatus* Phytoplasma sudamericanum', a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(4): 984-989.
- DAVIS, R. E., ZHAO, Y., DALLY, E. L., LEE, I. M., JOMANTIENE, R. and DOUGLAS, S. M. 2013. "*Candidatus* Phytoplasma pruni", a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: Multilocus characterization based on 16S rRNA, secY, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2): 766–776.
- DAVIS, R. E., HARRISON, N. A., ZHAO, Y., WEI, W., and DALLY, E. L. 2016. '*Candidatus* Phytoplasma hispanicum', a novel taxon associated with Mexican periwinkle virescence disease of *Catharanthus roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9): 3463–3467.
- DAVIS, R. E., ZHAO, Y., WEI, W., DALLY, E. L., and LEE, I. M. 2017. '*Candidatus* Phytoplasma luffae', a novel taxon associated with witches' broom disease of loofah, *Luffa aegyptica* Mill. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8): 3127–3133.

- DE FREITAS, P. A. F., DE CARVALHO, H. H., COSTA, J. H., DE SOUZA MIRANDA, R., DA CRUZ SARAIVA, K. D., DE OLIVEIRA, F. D. B., GOMES FILHO, D., PRISCO, J. T. AND GOMES-FILHO, E. 2019. Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism. *Plant Cell Reports*, 38:403-416.
- DE OLIVEIRA, E., MAGALHÃES, P. C., GOMIDE, R. L., VASCONCELOS, C. A., SOUZA, I. R., OLIVEIRA, C. M., CRUZ, I. AND SCHAFFERT, R. E. 2002. Growth and nutrition of mollicute-infected maize. *Plant Disease*, 86(9): 945-949.
- DERKSEN, H., RAMPITSCH, C. and DAAFY, F. 2013. Signalling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci.* 207:79-87.
- DERMASTIA, M., BERTACCINI, A., CONSTABLE, F. and MEHLE, N. 2017. Grapevine yellows diseases and their phytoplasma agents: biology and detection.
- DIKILITAS, M., SIMSEK, E. and KARAKAS, S. 2019. Stress responsive signaling molecules and genes under stressful environments in plants. In *Plant Signaling Molecules*, 19-42.
- DIKILITAS, M., SIMSEK, E. AND ROYCHOUDHUR, A. 2020. Role of proline and glycine betaine in overcoming abiotic stresses. In: *Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: biochemical and molecular perspectives*, eds. by A. Roychoudhury and D. K. Tripathi, pp. 1-23. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA.
- DOI, Y. O. J. I., TERANAKA, M., YORA, K., and ASUYAMA, H. 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Japanese Journal of Phytopathology*, 33(4): 259–266.
- DUDUK, B., PALTRINIERI, S., LEE, I.-M. and BERTACCINI, A. 2013. Nested PCR and RFLP Analysis Based on the 16S rRNA Gene. In: M. Dickinson & J. Hodgetts (Ed.), *Phytoplasma Methods and Protocols*, 159–171. Humana Press, Totowa, NJ.
- ESMAILZADEH-HOSSEINI, S., SALEHI, M. and MIRZAIE, A. 2011. Alternate hosts of alfalfa witches' broom phytoplasma and winter hosts of its vector *Orosius albicinctus* in Yazd-Iran. *Bulletin of Insectology*, 64, 247-S248.
- ESMAILZADEH-HOSSEINI, S., SALEHI, M., KHODAKARAMIAN, G., MIRCHENARI, S. M., BERTACCINI, A. 2015. An up to date status of alfalfa witches' broom disease in Iran. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5:9–18.
- FERNÁNDEZ, F. D., GALDEANO, E., KORNOWSKI, M. V., ARNEODO, J. D., and CONCI, L. R. 2016. Description of '*Candidatus Phytoplasma meliae*', a phytoplasma associated with Chinaberry (*Melia azedarach* L.) yellowing in South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12): 5244–5251.
- GALETTO, L., MARZACHI, C., MARQUES, R., GRAZIANO, C. and BOSCO, D. 2011. Effects of temperature and CO₂ on phytoplasma multiplication pattern in vector and plant. *Bull Insectol*, 64:151-S152.
- GETACHEW, M. A., MITCHELL, A., GURR, G. M., FLETCHER, M. J., PILKINGTON, L. J. NIKANDROW, A. and ELLIOT, E. 2007. First report of a "*Candidatus phytoplasma australiense*"-related strain in lucerne (*Medicago sativa*) in Australia. *Plant Disease*, 91(1): 111-111.

- GHOULAM, C., FOURSRY, A. and FARES, K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental And Experimental Botany*, 47(1): 39-50.
- GIRSOVA, N. V., BOTTNER-PARKER, K. D., BOGOUTDINOV, D. Z., KASTALYEVA, T. B., MESHKOV, Y. I., MOZHAEVA, K. A. and LEE, I. M. 2017. Diverse phytoplasmas associated with leguminous crops in Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 149(3): 599-610.
- GOPURENKO, D., FLETCHER, M. J., LIU, J. And GURR, G. M. 2016. Expanding and exploring the diversity of phytoplasmas from lucerne (*Medicago sativa*). *Scientific reports*, 6(1): 1-7.
- GRIFFITHS, H. M., SINCLAIR, W. A., SMART, C. D., and DAVIS, R. E. 1999. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: *Candidatus phytoplasma fraxini*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(4): 1605–1614.
- GHOULAM, C., FOURSRY, A. and FARES, K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 39-50.
- HAMEED, S., AKHTAR, K. P., HAMEED, A., GULZAR, T., KIRAN. S., YOUSAF, S., ABBAS, G., JAWAD, A. and SARWAR, N. 2017. Biochemical changes in the leaves of mungbean (*Vigna radiata*) plants infected by phytoplasma. *Turkish Journal of Biochemistry*. 42(6): 591–599.
- HARRISON, N. A., WOMACK, M. and CARPIO, M. L. (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(6): 676-681.
- HARRISON, N. A., DAVIS, R. E., OROPEZA, C., HELMICK, E. E., NARVÁEZ, M., EDEN-GREEN, S., DOLLET, M., and DICKINSON, M. 2014. “*Candidatus Phytoplasma palmicola*”, associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 6): 1890–1899.
- HE, M., HE, C.-Q. and DING, N.-Z. 2018. Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1771.
- HEATH, R. L. and PACKER, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198
- HIRUKI, C. and WANG, K. 2004. Clover proliferation phytoplasma: “*Candidatus 119 Phytoplasma trifolii*”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1349–1353.
- HOGENHOUT, S. A., OSHIMA, K., AMMAR, E. D., KAKIZAWA, S., KINGDOM, H. N. and NAMBA, S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular plant pathology*, 9(4): 403-423.
- HONG, Y., ZHAO, J., GUO, L., KIM, S.-C., DENG, X., WANG, G., ZHANG, G., LI, M. and WANG, X. 2016. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Progress in Lipid Research*. 62:55-74.
- HOSSEINI, S., BAHAR, M. and ZIRAK, L. 2013. Characterization of phytoplasmas related to peanut witches'-broom and stolbur groups associated with alfalfa diseases in Iran. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120(2): 70-76.

- IKTEN, C., CATAL, M., YOL, E., USTUN, R., FURAT, S., TOKER, C. and UZUN, B. 2014. Molecular identification, characterization and transmission of phytoplasmas associated with sesame phyllody in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 139(1), 217-229.
- IRPCM., 2004. “*Candidatus* Phytoplasma”, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 54: 1243–1255.
- JANMOHAMMADI, M., ZOLLA, L. and RINALDUCCI, S. 2015. Low temperature tolerance in plants: changes at the protein level. *Phytochemistry* 117:76-89.
- JARDİM, R. B., KİNOTİ, W. M., TRAN-NGUYEN, L. T., GAMBLEY, C., RODONİ, B. and CONSTABLE, F. E. 2021. ‘*Candidatus* Phytoplasma stylosanthis’, a novel taxon with a diverse host range in Australia, characterised using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, secA, tuf, and rp genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(1).
- JAYARAJ, J., BHUVANESWARI, R., RABINDRAN, R., MUTHUKRISHNAN, S. and VELAZHAHAN, R. 2010. Oxalic acid-induced resistance to *Rhizoctonia solani* in rice is associated with induction of phenolics, peroxidase and pathogenesis-related proteins. *Journal of Plant Interaction*, 5: 147-157.
- JUNG, H.-Y., SAWAYANAGI, T., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., MIYATA, S., OSHIMA, K., UGAKI, M., LEE, J.-T., HIBI, T., and NAMBA, S. 2002. “*Candidatus* Phytoplasma castaneae”, a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches’ broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5): 1543–1549.
- JUNG, H. Y., SAWAYANAGI, T., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., WEI, W., OSHIMA, K., MIYATA, S-I., UGAKI, M., HIBI, T. and NAMBA, S. 2003a. ‘*Candidatus* Phytoplasma ziziphi’, a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(4): 1037-1041.
- JUNG, H. Y., SAWAYANAGI, T., WONGKAEW, P., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., WEI, W., OSHIMA, K., MIYATA, S. I., UGAKI, M., HIBI, T. and NAMBA, S. 2003b. “*Candidatus* phytoplasma oryzae”, a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6): 1925–1929.
- JUNQUEIRA, A., BEDENDO, I. and PASCHOLATI, S. 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65:181-185.
- JONES, P., AROCHA, Y., and PLATA, G. 2005. First report of a ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ isolate associated with a witches’ broom disease of alfalfa in Bolivia. *Plant Pathol.* 54:559.
- JONES, L. M., PEASE, B., PERKINS, S. L., CONSTABLE, F. E., KINOTI, W. M., WARMINGTON, D., ALLGOOD, B., POWELL, S., TAYLOR, P., PEARCE, C. and DAVIS R. I. 2021. ‘*Candidatus* Phytoplasma dyspdisis’, a novel taxon associated with a lethal wilt disease of palms in Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(5).
- KARADAŞ, K. ve AKSOY, E. 2019. Iğdır ilinde yonca üretimi ve ekonomik önemi. *Zeugma II. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi*, 8-20 Ocak, Gaziantep, s. 334-343.

- KARAKAS, S. D. 2013. Development of tomato growing in soils differing in salt levels and effects of companion plants on some physiological parameters and soil remediation. Ph.D. thesis. Harran University, Şanlıurfa, Turkey.
- KARAKAS, S., DIKILITAS, M. and AKKURAK, H. 2021. Biochemical and DNA damage responses of hydroponically grown Elands sourfig (*Carpobrotus acinaciformis* L.) leaves to cadmium stress conditions. Appl. Ecol. Environ. Res. 19: 2649-2666.
- KARAKAS, S., DIKILITAS, M., ALMACA, A. and TIPIRDAMAZ, R. 2020. Physiological and biochemical responses of (*Aptenia cordifolia*) to salt stress and its remediative effect on saline soils. Appl. Ecol. Environ. Res. 18: 1329-1345.
- KARAKAS, S., DIKILITAŞ, M. and TIPIRDAMAZ, R. 2019. Biochemical and molecular tolerance of *Carpobrotus acinaciformis* L. halophyte plants exposed to high level of NaCl stress. Harran J. Agric. Food Sci. 23:99-107.
- KAYA, I., NEMLI, Y. and DEMIR, I. 2018. Taxonomic characteristics, distributions and hosts of dodder species (*Cuscuta* spp.) seen in agricultural and nonagricultural areas in Turkey. Turkish Journal of Weed Science, 21(1): 1-7.
- KHAN, A. J., AZAM, K. M., DEADMAN, M. L., AL-SUBHI, A. M., and JONES, P. 2001. First report of alfalfa witches broom disease in Oman caused by a phytoplasma of the 16SrII group. Plant Disease, 85(12):1287-1287.
- KHAN, A. J., BOTTI, S., AL-SUBHI, A. M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E. and BERTACCINI, A. 2002. Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches'-broom in Oman. Phytopathology, 92: 1038-1047.
- KIM, Y.-N., KHAN, M. A., KANG, S.-M., HAMAYUN, M. and LEE, I.-J. 2020. Enhancement of drought-stress tolerance of *Brassica oleracea* var. *italica* L. by newly isolated *Variovorax* sp. YNA59. Journal of Microbiology and Biotechnology, 30:1500-1509.
- KIRDAT, K., TIWAREKAR, B., THORAT, V., SATHE, S., SHOUCHE, Y. and YADAV, A. 2021. '*Candidatus* Phytoplasma sacchari', a novel taxon-associated with Sugarcane Grassy Shoot (SCGS) disease. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71(1): 004591.
- KIR, B. and SOYA, H. 2008. The investigation on some yield and quality characteristics of some pasture type alfalfa cultivars. Journal of Ege University Faculty of Agriculture, 45: 11-19.
- KUBALT, K. 2016. The role of phenolic compounds in plant resistance. Biotechnology and Food Sciences, 80: 97-108.
- LANGER, R. H. M. 1973. Lucerne. Pastures and Pasture Plants, Reed, Wellington, Nueva Zelanda.
- LEE, I. M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., DAVIS, R. E., and BARTOSZYK, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 48(4): 1153-1169.
- LEE, I.M., DAVIS, R.E. and GUNDERSEN-RINDAL, D.E., 2000. Phtoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annual Review of Microbiology, 54: 221-255.
- LEE, I. M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., DAVIS, R. E., BOTTFNER, K. D., MARCONE, C., and SEEMÜLLER, E. 2004a. '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related

- diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1037–1048.
- LEE, I. M., MARTINI, M., MARCONE, C., and ZHU, S. F. 2004b. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 122 “*Candidatus Phytoplasma ulmi*” for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2): 337–347.
- LEE, I. M., BOTTNER, K. D., SECOR, G., and RIVERA-VARAS, V. 2006. ‘*Candidatus Phytoplasma americanum*’, a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7): 1593–1597.
- LEE, I. M., BOTTNER-PARKER, K. D., ZHAO, Y., VILLALOBOS, W., and MOREIRA, L. 2011. “*Candidatus Phytoplasma costaricanum*” a novel phytoplasma associated with an emerging disease in soybean (*Glycine max*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(12): 2822–2826.
- LI, Z. N., ZHANG, L., MAN, J. Y. and WU, Y. F. 2012. Detection and identification of elm yellows group phytoplasma (16SrV) associated with alfalfa witches’ broom disease. *Journal of Phytopathology*, 160(6): 311-313.
- LOPES, M., SANCHES-SILVA, A., CASTILHO, M., CAVALEIRO, C. and RAMOS, F. 2021. Halophytes as source of bioactive phenolic compounds and their potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Advanced online publication,
- MAGBANUA, Z. V., DE MORAES, C. M., BROOKS, T. D., WILLIAMS, W. P. and LUTHE, D. S. 2007. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6): 697-706.
- MALEMBIC-MAHER, S., SALAR, P., FILIPPIN, L., CARLE, P., ANGELINI, E. and FOISSAC, X. 2011. Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of “*Candidatus phytoplasma rubi*”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9): 2129–2134.
- MARCONE, C., GIBB, K. S., STRETEN, C., and SCHNEIDER, B. 2004a. “*Candidatus Phytoplasma spartii*”, “*Candidatus Phytoplasma rhamni*” and “*Candidatus Phytoplasma allocasuarinae*”, respectively associated with spartium witches’-broom, buckthorn witches’-broom and allocasuarina yellows diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1025–1029.
- MARCONE, C., SCHNEIDER, B., and SEEMÜLLER, E. 2004b. “*Candidatus Phytoplasma cynodontis*”, the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1077–1082.
- MARTINI, M., MARCONE, C., MITROVIĆ, J., MAIXNER, M., DELIĆ, D., MYRTA, A., ERMACORA, P., BERTACCINI, A., and DUDUK, B. 2012. “*Candidatus Phytoplasma convolvuli*”, a new phytoplasma taxon associated with bindweed yellows in four European countries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12): 2910–2915.

- MARZACHI, C., VERATTI, F., D'AQUILIO, M., VISCHI, A., CONTI, M., and BOCCARDO, G. 2000. Molecular hybridization and PCR amplification of nonribosomal DNA to detect and differentiate stolbur phytoplasma isolates from Italy. *Journal of Plant pathology*, 201-212.
- MAUST, B. E., ESPADAS, F., TALAVERA, C., AGUILAR, M., SANTAMARIA, J. M. and OROPEZA, C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology*, 93(8): 976-981.
- MATILLA-VAZQUEZ, M. A. and MATILLA, A. J. 2014. Ethylene: role in plants under environmental stress. In: *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*, eds. by P. Ahmad and M. R. Wani, Vol. 2, pp. 189-222. Springer, New York, USA.
- MEGAX, 2020. <https://www.megasoftware.net/>, Erişim tarihi: 07.07.2021
- MICHAUD, R., LEHMAN, W. F., and RUMBAUGH, M. D. 1988. World distribution and historical development. *Alfalfa and alfalfa improvement*, 29: 25-91.
- MILOSEVIC, N. and SLUSARENKO, A. J. 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 143-158.
- MINITAB INC. 2020. Minitab 20 Statistical Software. Minitab Inc., State College, PA, USA.
- MIYAZAKI, A., SHIGAKI, T., KOINUMA, H., IWABUCHI, N., RAUKA, G. B., KEMBU, A., SAUL, J., WATANABE, K., NIJO, T., MAEJIMA, K., YAMAJI, Y. and NAMBA, S. 2018. '*Candidatus* Phytoplasma noviguineense', a novel taxon associated with Borgia coconut syndrome and banana wilt disease on the island of New Guinea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1): 170-175.
- MONTANO, H. G., DAVIS, R. E., DALLY, E. L., HOGENHOUT, S., PIMENTEL, J. P., and BRIOSO, P. S. T. 2001. '*Candidatus* Phytoplasma brasiliense, a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. 124 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3): 1109–1118.
- MOOT, D. J., BROWN, H. E., TEIXEIRA, E. I. and POLLOCK, K. M. 2003. Crop growth and development affect seasonal priorities for lucerne management. *NZGA: Research and Practice Series*, 11: 201-208.
- MUSETTI, R., PAOLACCI, A., CIAFFI, M., TANZARELLA, O. A., POLIZZOTTO, R., TUBARO, F., MIZZAU, M., ERMACORA, P., BADIANI, M. AND OSLER, R. 2010. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Phytopathology*, 100(4): 390-399.
- MUSETTI, R., BUXA, S. V., DE MARCO, F., LOSCHI, A., POLIZZOTTO, R., KOGEL, K. H. and VAN BEL, A. J. 2013. Phytoplasma-triggered Ca²⁺ influx is involved in sieve-tube blockage. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(4): 379-386.
- NALIWAYSKI, M. and SKŁODOWSKA, M. 2021. The relationship between the antioxidant system and proline metabolism in the leaves of cucumber plants acclimated to salt stress. *Cells*, 10: 609.

- NANDA, A. K., ANDRIO, E., MARINO, D., PAULY, N. and DUNAND, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of integrative plant biology*, 52(2): 195-204.
- NADERALI, N., NEJAT, N., VADAMALAI, G., DAVIS, R. E., WEI, W., HARRISON, N. A., KONG, L., KADIR, J., TAN, Y. H. and ZHAO, Y. 2017. ‘*Candidatus* Phytoplasma wodyetiae’, a new taxon associated with yellow decline disease of foxtail palm (*Wodyetia bifurcata*) in Malaysia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(10): 3765-3772.
- NEGRO, C., SABELLA, E., NICOLI, F., PIERRO, R., MATERAZZI, A., PANATTONI, A., APRILE, A., NUTRICATI, E., VERGINE, M., MICELI, A., DE BELLIS, L. and LUVISI, A. 2020. Biochemical changes in leaves of *Vitis vinifera* cv. sangiovese infected by Bois Noir Phytoplasma. *Pathogens*, 9(4): 269.
- NEJAT, N., VADAMALAI, G., DAVIS, R. E., HARRISON, N. A., SIJAM, K., DICKINSON, M., ABDULLAH, S. N. A., and ZHAO, Y. 2013. “*Candidatus* phytoplasma malaysianum”, a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(2): 540–548.
- NIU, Y. and XIANG, Y. 2018. An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, 9:915.
- OKUDA, H. 1972. Nonphysical noises and instabilities in plasma simulation due to a spatial grid. *Journal of Computational Physics*, 10(3): 475-486.
- OMAR, A. F. 2017. Detection and molecular characterization of phytoplasmas associated with vegetable and alfalfa crops in Qassim region. *Journal of Plant Interactions*, 12(1): 58-66.
- ÖZDEMİR, Z. and CAGIRGAN, M. I. 2015. Identification and characterization of a phytoplasma disease of jute (*Corchorus olitorius* L.) from south-western Turkey. *Crop Protection*, 74: 1-8.
- ÖZDEMİR, Z. (2018). Identification of phytoplasmas from *Neoliturus haematoceps* associated with sesame phyllody disease in southwestern Turkey. *Journal of Phytopathology*, 166(4): 242-248.
- PAN, R., LIU, J., WANG, S. and HU, J. 2020. Peroxisomes: versatile organelles with diverse roles in plants. *New Phytologist Foundation*, 225:1410-1427.
- PATEL, S. J., SUBRAMANIAN, R. B. and JHA, Y. S. 2011. Biochemical and molecular studies of early blight disease in tomato. *Phytoparasitica*, 39:269-283.
- PETERS, R. D., LEE, M. E., GRAU, C. R., DRISCOLL, S. J., WINBERG, R. M., KURTZWEIL, N. C., LUKAESKO VE L. A. and LEE, I. M. 1999. First report of aster yellows phytoplasma in alfalfa. *Plant Disease*, 83(5): 488-488.
- PIETERCE, C. M. J., VAN DER DOES, D., ZAMIOUDIS, C., LEON-REYES, A. and VAN WEES, S. C. M. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28:489-521.
- PILKINGTON, L., GURR, G. M., FLETCHER, M. J., NIKANDROW, A. and ELLIOTT, E. 1999. Occurrence and severity of lucerne yellows disease in Australian lucerne seed crops. *Australasian Plant Pathology*, 28(3): 235-239.
- PILKINGTON, L. J., GIBB, K. S., GURR, G. M., FLETCHER, M. J., NIKANDROW, A., ELLIOTT, E., DE VAN, R. and READ, D. M. Y. 2003. Detection and identification of a phytoplasma from lucerne with Australian lucerne yellows disease. *Plant Pathology*, 52(6): 754-762.

- PLOAIE, P. G., 1981. Mycoplasma-like organisms and plant diseases in Europe. In Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology. Maramorosch, K., and Harris, K. F., eds. Academic Press, New York, 61- 104
- POÓR, P., BORBÉLY, P., BÓDI, N., BAGYÁNSZKI, M. and TARI, I. 2019. Effects of salicylic acid on photosynthetic activity and chloroplast morphology under light and prolonged darkness. *Photosynthetica*, 57: 367-376.
- POROTIKOVA, E. V., YURCHENKO, E. G., and VINOGRADOVA, S. V. 2020. First Report of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ associated with Bois Noir on Grapevine (*Vitis vinifera*) in Krasnodar Region of Russia. *Plant Disease*, 104(1): 277–277.
- QUAGLINO, F., ZHAO, Y., CASATI, P., BULGARI, D., BIANCO, P. A., WEI, W. and DAVIS, R. E. 2013. “*Candidatus Phytoplasma solani*”, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART8): 2879–2894.
- RAIESI, T. and GOLMOHAMMADI, M. 2020. Changes in nutrient concentrations and biochemical characteristics of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) infected by phytoplasma. *Journal of General Plant Pathology*, 86: 486-493.
- RAINSFORD, K. D. 2004. Aspirin and related drugs. Taylor & Francis, London, UK, pp. 1-23.
- RASOULI, H., FARZAEI, M. H., MANSOURI, K., MOHAMMADZADEH, S. and KHODARAHMI, R. 2016. Plant cell cancer: may natural phenolic compounds prevent onset and development of plant cell malignancy? A literature review. *Molecules*, 21(9): 1104.
- RAWAT, N., SINGLA-PAREEK, S. L. and PAREEK, A. 2020. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same. *Physiologia Plantarum*, 171:653-676.
- RAZA, A., CHARAGH, S., ZAHID, Z., MUBARIK, M. S., JAVED, R., SIDDIQUI, M. H. and HASANUZZAMAN, M. 2021. Jasmonic acid: a key frontier in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 40:1513-1541.
- ROSAHL, S. and FEUSSNER, I. 2004. Oxylipins. In: *Plant lipids: biology, utilisation and manipulation*, ed. by D. J. Murphy, pp. 329-454. Blackwell, Oxford, UK.
- RUSJAN, D. and MIKULIC-PETKOVSEK, M. 2015. Phenolic responses in 1-year-old canes of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay induced by grapevine yellows (Bois noir). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1): 123-134.
- RUSSELLE, P. R. 2001. Alfalfa: After an 8,000-year journey, the "Queen of Forages" stands poised to enjoy renewed popularity. *American Scientist*, 89(3): 252-261.
- ŠAFÁŘOVÁ, D., ZEMÁNEK, T., VÁLOVÁ, P., and NAVRÁTIL, M. 2016. ‘*Candidatus phytoplasma cirsii*’, a novel taxon from creeping thistle [*Cirsium arvense* (L.) Scop.]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(4): 1745–1753.
- SALARI, M., PANJEHKEH, N., NASIRPOOR, Z. and ABKHOO, J. 2012. Reaction of melon (*Cucumis melo* L.) cultivars to soil-borne plant pathogenic fungi in Iran. *African Journal of Biotechnology*, 11:15324-15329.
- SAWAYANAGI, T., HORIKOSHI, N., KANEHIRA, T., SHINOHARA, M., BERTACCINI, A., COUSIN, M. T., HIRUKI, C., and NAMBA, S. 1999. “*Candidatus Phytoplasma japonicum*”, a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3): 1275–1285.

- SCHNEIDER, B., TORRES, E., MARTÍN, M. P., SCHRÖDER, M., BEHNKE, H. D., and SEEMÜLLER, E. 2005. “*Candidatus Phytoplasma pini*”, a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1): 303–307.
- SEEMULLER, E., GARNIER, M. and SCHNEIDER, B., 2002. Mycoplasmas of plants and insects (S. Razin and R. Herrmann, Editör). In: *Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 5: 91-116, New York.
- SEEMULLER, E., and SCHNEIDER, B. 2004. ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1217–1226.
- SHARMA, P. and GAYEN, D. 2021. Plant protease as regulator and signaling molecule for enhancing environmental stress-tolerance. *Plant Cell Reports*, 40:2081-2095.
- SHETTY, K., CURTIS, O. F., LEVIN, R. E., WIKOWSKY, R. and ANG, W. 1995. Prevention of verification associated with in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *J Plant Physiol*. 147: 447-451.
- SIDDIQUE, Z., AKHTAR, K. P., HAMEED, A., SARWAR, N., HAQ, I. U. and KHAN, S. A. 2014. Biochemical alterations in leaves of resistant and susceptible cotton genotypes infected systemically by cotton leaf curl Burewala virus. *Journal of Plant Interactions*, 9:702-711.
- SINGH, H. P., KAUR, S., BATISH, D. R. and KOHLI, R. K. 2014. Ferulic acid impair rhizogenesis and root growth, and alters associated biochemical changes in mung bean (*Vigna radiata*) hypocotyls. *J. Plant Interact.* 9:267-274.
- SURYANARAYANA, V., SINGH, S. J., MUNIYAPPA, V. and REDDY, H. R. 1996. Little leaf of *Medicago sativa* L.-A new phytoplasma disease in India. *International Journal of Tropical Plant Diseases*, 14(2), 167-171.
- STAROVIĆ, M., KUZMANOVIĆ, S., GAVRILOVIĆ, V., ALEKSIĆ, G., POPOVIĆ, T., STOJANOVIĆ, S. and JOŠIĆ, D. 2012. Detection and Identification of Two Phytoplasmas (16SrIII-B and 16SrXII-A) From Alfalfa (*Medicago sativa*) in Serbia. *Journal of Phytopathology*, 160(11-12): 758-760.
- STASWICK, P. E. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45:303-322.
- TAHIR, M. N., HOLLAND, C. W., SAMAC, D. A. and MOLLOV, D. 2017. First Report of 16Sr II (‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’) Subgroup-D Phytoplasma Associated with Alfalfa in Sudan. *Plant Disease*, 101(12), 2144-2144.
- TUIK, Bitkisel Üretim İstatistikleri, 2022. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>, Erişim tarihi: 27.07.2023.
- TULADHAR, P., SASIDHARAN, S. and SAUDAGAR, P. 2021. Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses. In: *Biocontrol agents and secondary metabolites: applications and immunization for plant growth and protection*, ed. by S. Jogaiah, pp. 419-441. Woodhead Publishing, Cambridge, UK.

- TYMON, A. M., JONES, P. and HARRISON, N. A. 1998. Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers. *Annals of Applied Biology*, 132(3): 437-452.
- UNDERWOOD, W. 2012. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in plant science*, 3: 85.
- VALIUNAS, D., STANIULIS, J., and DAVIS, R. E. 2006. “*Candidatus* Phytoplasma fragariae” a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1): 277–281.
- VERDIN, E., SALAR, P., DANET, J. L., CHOUEIRI, E., JREIJIRI, F., EL ZAMMAR, S., GÉLIE, B., BOVÉ, J. M., and GARNIER, M. 2003. “*Candidatus* phytoplasma phoenicium” sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3): 833–838.
- WARRIER, R. R., PAUL, M. and VINEETHA, M. V. 2013. Estimation of salicylic acid in Eucalyptus leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and Plant Physiology*, 3:90-97.
- WEI, W., LEE, M., DAVID R. E., SUO, X. and ZHAO, Y. 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(10): 2368-2377.
- WILSON, D., BLANCHE, K. R. and GIBB, K. S. 2001. Phytoplasmas and disease symptoms of crops and weeds in the semi-arid tropics of the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 30(2): 159-163.
- WIN, N. K. K., LEE, S. Y., BERTACCINI, A., NAMBA, S., and JUNG, H. Y. 2013. “*Candidatus* Phytoplasma balanitae” associated with witches’ broom disease of *Balanites triflora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2): 636–640.
- WEINTRAUB P. G. and L. A. BEANLAND, 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Revue of Entomology* 51: 91–111.
- XUE, C., LIU, Z., DAI, L., BU, J., LIU, M., ZHAO, Z., JIANG, Z., GAO, W., and ZHAO, J. 2018. Changing Host Photosynthetic, Carbohydrate, and Energy Metabolisms Play Important Roles in Phytoplasma Infection. *Phytopathology*, 108(9): 1067–1077.
- YANG, R. R., HAN, Y., HAN, Z., ACKAH, S., LI, Z., BI, Y., YANG, Q. and PRUSKY, D. 2020. Hot water dipping stimulated wound healing of potato tubers. *Postharvest Biology and Technology*, 167:111245.
- YASMIN, H., BANO, A., WILSON, N. L., NOSHEEN, A., NAZ, R., HASSAN, M. N., ILYAS, N., SALEEM, M. H., NOURELDEEN, A., AHMAD, P. and KENNEDY, I. 2021. Drought-tolerant *Pseudomonas* sp. showed differential expression of stress-responsive genes and induced drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 174(1): e13497.
- ZAFARI, S., NIKNAM, V., MUSETTI, R. and NOORBAKHS, S. N. 2012. Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*). *Acta Physiologiae Plantarum*. 34: 561–568.
- ZHAO, Y., SUN, Q., WEI, W., DAVIS, R. E., WU, W., and LIU, Q. 2009a. ‘*Candidatus* phytoplasma tamaricis’, a novel taxon discovered in witches’-

- broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10): 2496–2504.
- ZHAO, Y., WEI, W., DAVIS, R. E. and LEE, I. M. 2009b. Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts and vectors*, 64-92.
- ZHAO, Y., WEI, W., LEE, M., SHAO, J., SUO, X., & DAVIS, R. E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10): 2582.
- ZREIK, L., CARLE, P., BOVE, J. M., and GARNIER, M. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with Witches'- broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, "*Candidatus* phytoplasma aurantifolia". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3): 449–453.

