

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FİTOPLAZMA İLE İNFEKTELİ BİBER BİTKİLERİNİN NaCl STRESİ
ALTINDAKİ FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL TEPKİLERİ**

Sıdıka DURMUŞ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2022**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal	11
3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitkisel materyaller.....	11
3.1.2. PCR ve RFLP çalışmaları için materyalin oluşturulması	11
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Örneklerin toplanması ve NaCl uygulamaları	12
3.2.2. DNA ekstraksiyonu çalışmaları.....	13
3.2.3. PCR çalışmalarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonlarının ayarlanması	14
3.2.4. Hedef bölgelerin çoğaltılması (PCR).....	15
3.2.5. Agaroz jel ve elektroforez çalışmaları	15
3.2.6. Sanal (in silico) RFLP ve filogenetik ağaç analizleri.....	16
3.3. Bitki Biyokimyasal Analizler	17
3.3.1. Klorofil analizi	17
3.3.2. Prolin analizi	18
3.3.3. Lipit peroksidaz (MDA) analizi.....	18
3.3.5. Katalaz analizi (CAT, E.C.1.11.1.6).....	19
3.3.6. Protein analizi.....	19
3.3.7. Fenol analizi.....	20
3.3.8. Jasmonik asit analizi	20
3.3.9. Salisilik asit analizi	21
3.3.10. İstatistik analizi.....	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	22
4.1. Survey Çalışmaları ve Örnekleme	22
4.2. Moleküler Çalışmalar.....	26
4.2.2. Sekans analizi ve filogenetik ağaç	27
4.2.3. Sanal (in silico) RFLP	30
Biyokimyasal analiz sonuçları.....	31
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	37

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FİTOPLAZMA İLE İNFEKTELİ BİBER BİTKİLERİNİN NaCl STRESİ ALTINDAKİ FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL TEPKİLERİ

Sıdıka DURMUŞ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Murat DİKİLİTAŞ
Yıl: 2022, Sayfa: 46

Dünya’da ve Türkiye’de önemli bir üretim ve tüketim sahasına sahip olan biber (*Capsicum annuum*), artan dünya nüfusu ile abiotik ve biyotik stres faktörlerine de maruz kalmaktadır. Küresel ısınma ve aşırı sulama ile toprakta tuz birikimi artmakta, bu koşullar altında biyotik stres faktörlerinin yıkıcı etkisi daha şiddetli olarak görülmektedir. Bu çalışma, doğal olarak fitoplazma etmeni ile infektelenmiş biber bitkilerinin tepkisi suni olarak oluşturulmuş NaCl stresi altında incelenmiştir. Sararma, çalılışma, bodurluk ve küçük yaprak oluşumu gibi tipik fitoplazma belirtileri görünen biber bitkileri PCR yöntemi ile fitoplazma açısından test edilmiş, etmenin ‘*Candidatus Phytoplasma*’ olduğu belirlenmiştir. Çalışmada fitoplazma etmeni ile bulaşık olduğu belirlenen ve sağlıklı kontrol bitkileri üzerinde tesadüf parselleri deneme desenine göre dört grupta üç tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. Bu gruplar; a) kontrol, b) fitoplazma ile infekteli bitkiler, c) 100 mmol L⁻¹ NaCl uygulaması yapılan sağlıklı bitkiler, d) 100 mmol L⁻¹ NaCl uygulanan fitoplazma ile infekteli bitkiler. Her bir grupta yer alan bitkiler su ihtiyacına göre (2-3 gün ara ile) dört hafta boyunca su ve tuz çözeltisi içeren suyla sulanmıştır. Muameleler sonucunda infekteli biber bitkilerinin 10. ve 30. gününde alınan örneklerden yapılan biyokimyasal analizlerde; klorofil (toplam, *a* ve *b*), fenol, CAT, JA ve SA’ın kontrol grubuna kıyasla azalış olduğu ancak protein, prolin, MDA ve POX değerlerinde artış olduğu belirlenmiştir. NaCl ile muamele edilen ‘*Candidatus Phytoplasma*’-infekteli biber bitkilerinde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna kıyasla klorofil (toplam, *a* ve *b*), protein, CAT, POX, JA ve SA değerlerinin azaldığı fakat fenol, prolin ve MDA değerlerinin arttığı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Biber, fitoplazma, PCR-RFLP, tuz stresi, biyokimyasal analiz

ABSTRACT

MSc Thesis

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF PHYTOPLASMA INFECTED PEPPER PLANTS UNDER NaCl STRESS

Sıdıka DURMUŞ

Harran University
Graduateschool of Natural and Applied
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Murat DİKİLİTAS
Year: 2022, Page: 46

Pepper (*Capsicum annuum*), which has an important production and consumption area in the world and in Turkey, is also exposed to abiotic and biotic stress factors with the increasing world population. With global warming and excessive irrigation, salt accumulation in the soil increases, and under these conditions, the destructive effect of biotic stress factors is seen to be more severe. In this study, the response of pepper plants naturally infected with phytoplasma was investigated under artificially formed NaCl stress. Pepper plants with typical phytoplasma symptoms such as yellowing, witches' broom, stunting and small leaves were tested for phytoplasma by PCR method, and it was determined that the agent was 'Candidatus Phytoplasma'. The study was carried out in four groups with three replications according to the randomized plot design on plants and healthy plants determined to be contaminated with phytoplasma agent. These groups are; a) control, b) plants infected with phytoplasma, c) healthy plants treated with 100 mmol L⁻¹ NaCl, d) plants infected with phytoplasma treated with 100 mmol L⁻¹ NaCl. The plants in each group were irrigated with water and salt solution for four weeks (2-3 day intervals) according to their water needs. In the biochemical analyzes made from the samples taken on the 10th and 30th days of the infected pepper plants as a result of the treatments; It was determined that chlorophyll (total, *a* and *b*), phenol, CAT, JA and SA decreased compared to the control group, but there was an increase in protein, proline, MDA and POX values. In the measurements made on 'Candidatus Phytoplasma'-infected pepper plants treated with NaCl; it was determined that chlorophyll (total, *a* and *b*), protein, CAT, POX, JA and SA values decreased, but phenol, proline and MDA values increased compared to the control group.

KEYWORDS: Pepper, Phytoplasma, PCR-RFLP, salt stress, biochemical analysis

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamda bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her konuda destek olan, değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ. 'a ve Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Ertuęrul GÜLDÜR'e, Doktora öğrencileri; Hümevra AYWACI, Nesibe KILIÇ, Süleyman ÇAKMAK ve Beritan ÇAPA'ya, Dr. Havva AKKURAK, Araştırma Görevlisi Dr. Eray ŐİMŐEK'e ve Yüksek Lisans öğrencisi Ayőe Hümevra Koçakoęlu'na sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

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



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4. 1. Sağlıklı biber bitkisine tuz çözeltisi uygulamadan önce (a, c). Sağlıklı biber bitkisine tuz çözeltisi uygulandıktan bir ay sonrası (b, d).....	23
Şekil 4. 2. Fitoplazma ile infekteli biber bitkisi tuz çözeltisi uygulamadan önce (a,c). Fitoplazma ile infekteli biber bitkisi tuz çözeltisi uygulandıktan bir ay sonrası (b,d).....	24
Şekil 4. 3. a) Fitoplazma ile infekteli + NaCl ile muamele edilen bitki, b) NaCl ile muamele edilen bitki, c) Fitoplazma ile infekteli bitki, d) Kontrol	25
Şekil 4.4. Nested-PCR ürünlerinin görüntüsü (%1'lik agaroz jel). 11-17: fitoplazma ile infekteli biber bitkileri, 18: Pozitif kontrol (GenBank Erişim Numarası: U15442); 20: Negatif kontrol; M: 1 bp marker.	26
Şekil 4.5. Fitoplazma ile infekte olan biber bitkileri örnekleri 43 fitoplazma türünün 16SrRNA gen dizilemesine göre <i>neighbour-joining</i> metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç.....	28
Şekil 4.6. F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan biber bitki izolatları ve 16SrII-B ve 16II-D alt gruplarının kıyaslanması ile oluşturulan <i>in silico</i> RFLP görseli.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3. 1. PCR analizlerinde kullanılan baz dizileri ve primerler	
Çizelge 3. 2. PCR kullanılan primerlerin çalışma koşulları.....	15
Çizelge 5. 1. ' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ' ile infekte edilmiş biber bitkileri biyokimyasal parametreleri.....	31
Çizelge 5. 2. ' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ' ile infekte edilmiş ve NaCl (100 mmol L ⁻¹) sulama suyu ile sulanan biber bitkileri biyokimyasal parametreleri.....	32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

bp	Baz çifti (base pair)
°C	Santigrat derece
CAT	Katalaz
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
d	Dakika
da	Dekar
ddH ₂ O	Çift distile su
DNA	Deoksiribo nükleik Asid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ESFY	European stone fruit yellows
EtBr	Ethidium Bromide
ETOH	Ethanol
g	Gram
JA	Jasmonik asit
MDA	Malondialdehit
mg	Mili gram
ml	Mili litre
MLO	Mikoplazma Benzeri Organizma
mmol L ⁻¹	Mili molar
NaCl	Sodium Chloride
ng	Nano gram
nm	Nano metre
PCR	Polymeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	Piko mol
POX	Peroksidaz
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SA	Salisilik asit
TAE	Tris asetat EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Biber bitkisi Solanaceae ailesi içerisinde yer alan; Magnoliopsida sınıfının, Solanales takımının, *Capsium* L. cinsi grubunda yer alır.

Biberin köken olarak Orta Amerika'dan geldiği düşünülmektedir. Biberin farklı bölgelere uyum sağlaması farklı türlerin oluşumuna sebep olmuştur (McLeod ve ark., 1983). Amerika'da yetiştirilen ilk bitkilerden biri olan biber, M.Ö 7.500 yıllarında yetiştirildiği görülmüştür. Çin ve Hindistan'a buradan yayılmış, daha sonra Avrupa kıtasına ve Afrikaya yayılmıştır (Tripodi ve ark., 2021).

Biber bitkisi sıcak ve ılıman iklim şartlarında yetişebilen tek ya da birkaç yıllık türdür. Uygun gelişim ortamı için havanın ve toprağın nemi, ışık, sıcaklık, gibi unsurlar önemli dış etmenlerdir. Gelişimini tamamlayamamış biberler, tuhaf şekiller gösterirler ve sert meyvelerin en önemli sebeplerinden birinin olumsuz çevre koşulları olduğu görülmüştür (Hernandez-Perez ve ark., 2020).

Biber bitkisi düşük sıcaklıklara hassas olduğundan sıcaklık -2°C ila -3°C arasında olduğunda gelişimi durur. Don tehdidinden dolayı fidelerin viollerde yetiştirilip hava ve toprak sıcaklığı uygun koşullara ulaştığında dikimi yapılmalıdır (Ji ve ark., 2020).

Biber, Türkiye'nin her bölgesinde yetiştirilmekle birlikte Akdeniz, Marmara, Karadeniz ve Ege bölgesinde yaygın olarak tarımı yapılmaktadır. Marmara ve Ege bölgelerinde biber tarımı, sofralık ve gıda endüstrisinde, Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da ise genel olarak toz ve pul biber için üretilmektedir. Üretimin çoğunluğu iç pazarda tüketilirken, %2'lik küçük bir kısmı ise dış ülkelere satılmaktadır (Kılıç, 2020). Biber önemli bir besin maddesi olmasının yanı sıra; son dönemlerde kozmetik ve ilaç sanayisinde de önemi giderek artmaktadır (Baenas ve ark., 2019).

Türkiye’de 2021 TÜİK verilerine göre dolmalık, çarliston, salçalık, kapyra ve sivri biber olmak üzere toplamda 3.091.295 ton biber üretilmiştir (TÜİK, 2021).

Ülkemizde ve dünyada üretim payı artan ve ekonomik olarak önem arz eden biber yetiştiriciliğini kısıtlayan önemli faktörler; biyotik hastalık ve abiyotik stres etmenleridir. Fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar önemli biyotik faktörler arasında iken; abiyotik faktörler ise nem, kuraklık, sıcaklık ve tuzluluk gibi faktörler olup biber yetiştiriciliğini önemli ölçüde kısıtlamaktadır (Choudhary ve ark., 2016).

Son yıllarda biber üretim alanlarının çoğunda fitoplazma adı verilen; bir noktada birden fazla sürgün oluşumu, sararmalar, bodurluk, çiçek kısırlığı ve yaprak nekrozları gibi belirtiler gösteren; moleküler yöntemler ile tanımlanabilen bakteriyel patojenler tespit edilmiştir (Krishnan ve ark., 2019).

Fitoplazmalar; Prokaryotae aleminin Mollicute sınıfında yer alan floemle sınırlı, hücre duvarı bulunmayan, bitkilerin floem dokularında veya bazı böcek türlerinde obligat parazit olarak yaşayan bakterilerdir (Bertaccini ve ark., 2019).

Daha önceleri virüs ya da virüs benzeri hastalık etmeni sanılan fitoplazmalar önemli bitki hastalıkları arasındadır (Rao. 2021). Mikoplazmalara benzetmesinden dolayı mikoplazma benzeri organizmalar (MBO: MLO: Mycoplasma-like organism) olarak isimlendirilmiştir (Doi ve ark., 1967). Gelişen biyolojik yöntemler ile birlikte fitoplazmaların aşısı, vektör, hatta yabancı otlar ile canlı dokulara taşındıkları belirlenmiştir (Maejima ve ark., 2020). Fitoplazmalar böcek ve bitki arasında etkileşim halinde olduğundan bu sayede yayılımını ve canlılığını korumaktadırlar (Hogenhout ve ark., 2008).

Fitoplazmalar dünyada ekonomik öneme sahip süs bitkileri, sebze ve meyvelerde önemli hastalıklara yol açmakta ve bazı kültür bitkilerinde verim bakımından en önemli sınırlayıcı biyotik etmen olarak saptanmıştır (Bertaccini ve ark., 2018). Japonya’da 1967 yılında infekteli dut ağacında ilk kez fitoplazma tespit edilmiştir (Zhu ve ark., 1998).

Fitoplazma ile enfekte olan bitkilerde besin maddesi taşınımını engellendiğinden yaşlı yapraklarda anormal olarak karbohidrat birikimi meydana gelmekte, karbohidrat birikimi meyve ve çiçek gibi organlarda gelişim geriliğine neden olmaktadır (Maust ve ark., 2003). Glukoz, fruktoz ve karbohidrat transferinin floem dokuları ile yapıldığı bilindiğinden ve fitoplazmaların da floem dokularında enfeksiyona neden olduğu tespit edildiğinden, bu durumun ortaya çıkması normal bir hastalık sendromu olarak görülmektedir. Ancak boyutları mikron düzeyinde olan fitoplazmaların fiziksel olarak iletim demetlerini tıkamasının mümkün olmayacağı değerlendirilmiştir. Fitoplazmaların etki mekanizması hala tam olarak anlaşılammakla birlikte, klorofil ve karbonhidrat translokasyonları ile ilgili biyokimyasal sistemin gen ekspresyon işleyişini etkilediği düşünülmektedir.

Herhangi bir kimyasal mücadelesi olmayan fitoplazma hastalığı son dönemlerde yaygın olarak araştırılması ve alternatif mücadele yöntemleri için hastalığın mekanizmasının iyi anlaşılması gerekmektedir. Elde edilen sonuçlar enfeksiyon öncesi ve sonrasında önlem almamıza yardımcı olacaktır (Gurr ve ark., 2016). Fitoplazmaların yayılımını kolaylaştıran vektör böceklerle mücadele etmek, konukçu yabancı otları kontrol altına almak, fitoplazmalara karşı dayanıksız bitkilerin ekimi ve dikiminden kaçınmak gibi alternatif mücadele yöntemleri büyük önem arz etmektedir (Alma ve ark., 2019).

Biberde fitoplazmanın yanı sıra abiotik bir diğer stres faktörü olan toprakta tuz birikimi de bitkinin büyümesini, gelişimini ve verimini önemli ölçüde etkilemektedir (Shams ve ark., 2019).

Tuzluluk; yarı kurak ve kurak iklim bölgelerinde çözünebilir tuzların aşırı artan sulama ile birlikte artan taban suyunun kapilarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve suyun buharlaşması sonucu tuzun toprak yüzeyine yakın bölümünde ve toprak yüzeyinde birikmesidir (Moustafa-Farag ve ark., 2020). Topraktaki tuzluluk abiotik stres faktörlerinden olup bitkinin hem toprak altı hemde toprak üstü aksamında birçok olumsuzluklara neden olmaktadır (Khan ve ark., 2020). Topraktaki tuzluluğa yol açan bileşikler klorürler, nitratlar, sülfatlar, karbonatlar, bikarbonatlar ve

boratlardır, fakat NaCl stresi en yaygın olanıdır (Bui, 2017). Tuz (NaCl) oranının toprak çözeltisinde %0.5'ten fazla bulunması toprağın tuzlu toprak olarak kabul edilmesi anlamına gelmektedir (Blum, 1984; Chen ve ark., 2020).

Bitkilerin kök çevresinde çözünmüş tuzların artması ozmotik basıncın da artmasına neden olmakta ve toprakta bulunan suyun alınmasında güçlük çekmesi ve toksik iyonların artması ile toksisite durumu ortaya çıkmaktadır (Wang ve ark.,2021). Tuz stresinden dolayı oluşan stomaların kapanması ile su kaybı engellenirken fotosentez için ihtiyaç duyulan CO₂'nin alınımı da kısıtlanır. Bitkilerde; sararma, nekroz, solgunluk, cüceleşme, verim kaybı, yaprak ve kök ölümü gibi belirtiler tuz stresinin başlıca belirtileridir (Kwon ve ark., 2019). Yüksek tuz konsantrasyonu nedeniyle bitkide iyon birikimi ve stomaların kapanması, klorofilde azalışa neden olmaktadır. Tuz stresi altında klorofil-*a* (chl-*a*), klorofil-*b* (chl-*b*), toplam klorofil (chl) azalış göstermektedir (Ahmad ve ark., 2019). Tuz stresinden kaynaklı olarak protein sentezi inhibe edilmekte ve bitkide protein miktarı azalmaktadır (Arif ve ark., 2020).

Tuz stresine karşı bitkide bazı savunma mekanizmaları mevcut olmakla birlikte bitkinin bu koşullarda salgıladıkları enzimler bitkiyi strese karşı korumak adına kalkan oluşturmaktadır. Fenolik bileşikler, bitki stres altındayken üretilen reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlar ve serbest radikalleri temizlemede önemli görevler üstlenirler (Waskiewicz ve ark., 2013). Qiu ve ark. (2014) tuz stresi altındaki buğday bitkisinde jasmonik asitin (JA) tuz stresini azaltarak bitkiyi koruma altına alırken bitkinin gelişim ve büyümesinde önemli rol oynadığını saptamışlardır.

Tuz stresi altındaki bitkilere dışarıdan salisitik asit (SA) uygulandığında tuz stresinin etkilerinin büyük ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (El-Esawi ve ark., 2017). Tuz stresi altında yaşanan biber yapraklarında, artan Na⁺ ve Cl⁻ iyonları ile birlikte lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehitte (MDA) seviyesinin arttığı görülmüştür (Shams ve ark., 2019). Domates bitkisinde, tuz stresi muamelesinden sonra katalaz (CAT) enzimi artış göstermiştir (Li, 2009). Prolin; hidroksil radikallerinin düzenlenmesinde, hücrelerin stabilizasyonu, ozmotik basıncın ve

sitozolik pH'nın ayarlanmasında rol oynayan etkili bir organik maddedir (Shakeri ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda tuza dayanıklı bitki türlerinde prolin konsantrasyonu yüksek oranlarda tespit edilmiştir (El-Moukhtari ve ark., 2020). Abiotik stres koşullarında dayanıklı bitkilerde CAT, POX aktivitesi artarak hücreye zarar veren serbest radikallerin olumsuz etkilerini azaltmaktadır (Altunlu, 2019).

Biotik ve abiotik stres faktörleri bitkilerin gelişimini olumsuz etkilediğinden, bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal değişimler meydana gelmektedir (Dikilitaş ve ark., 2009). Bu iki stres faktörünün bitki bünyesinde aynı anda bulunması durumunda oluşacak değişimler ise hala araştırılmakta olan konular arasındadır (Ravat ve ark., 2013).

Bu çalışmada fitoplazma ile infekteli olduğu tespit edilen biber bitkilerine tuz uygulaması yapılarak bitkide hem hastalık hem de tuz stresinin ayrı ayrı ve birlikte etkileri değerlendirilmiştir. Hastalık etmeninin floem iletim sisteminde enfeksiyon yapması glukoz, karbohidrat ve aminoasit taşınımının genç dokulara iletiminde olumsuz etkiye sahip olması nedeniyle çiçek ve meyve veriminin hem kantite hem de kalite açısından olumsuz etkilediği bilinmektedir. NaCl minarelerinin ise sulama sonucu bitki iletim demetlerinden ksilem sistemi vasıtası ile bitkinin üst kısımlarına taşındığı bilinmektedir. Dolayısı ile her iki stres faktörlerinin farklı iletim demetlerini kullanarak strese neden olduğu görüldüğünden, her iki stres faktörünün kombine olarak biber bitkisi üzerindeki sıralı (sequential) ya da aynı andaki (simultaneous) etkileri daha önce yeterince çalışılmadığı gibi bitki savunma sisteminin iki farklı karakterdeki stres tiplerine tepkisi diğer bitkilerin savunma sistemlerini anlamak için de model olacaktır. Bu alanda yapılacak çalışmalara temel oluşturacağı gibi ıslah çalışmaları için de önemli veriler sunacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fitoplazmalar, Mollicutes sınıfından hücre duvarı olmayan yalnızca floemde yaşayan bitki patojeni bakterilerdir (Bertaccini, 2021).

Elma çoklu sürgün fitoplazma hastalığı (AP) fitoplazmaların floem vasıtası ile beslenen psyllidler ve aşı ile taşındığı tespit edilmiştir (Oppedisano ve ark., 2020).

Fitoplazmalar Hemiptera takımından; Cicadellidae, Fulgoridae, Psyllidae familyalarında yer alan böcek türleri; üretim materyalleri (aşı, tohum, çelik vb.) ve küsküt köprüleriyle taşınmaktadır (Ghosh ve ark., 2019).

Fitoplazmalar, vektör böceklerin beslenmeleri esnasında böceğin vücuduna giriş yapar ve bu böcekler vasıtasıyla bitkiler arasında yayılım gösterirler. Fitoplazmalar böcek hemolimfinde ve bitki floeminde çoğalır ve yaşarlar (Bertaccini., 2021).

Bitkinin floem dokularında bulduklarından bitkide sistemik olarak hareket etme imkânı bulurlar. Vektör böceklerin vücudunda ya da konukçu bitkilerde kışı geçirirler (Alma ve ark., 2019). Bazı çalışmalarda fitoplazmaların konukçu oldukları bitki aksamalarında düzensiz olarak yayıldığı belirlenmiştir (Seemüller ve ark., 1984). Aynı zamanda fitoplazma yoğunluğu odunsu bitkilerde mevsimsel olarak farklılık göstermiştir. Fitoplazmalar havanın soğuk olduğu zamanlarda, özellikle odunsu bitkilerde kök ve gövdede iken havaların ısınmasıyla birlikte vejetatif aksamlara doğru yayılırlar (Nolte ve ark., 2020).

Yaklaşık 600'den fazla bitki hastalıklarına neden olan fitoplazmalar birçok bitki çeşidine etki etmektedir (Trivellone ve Dietrich. 2021). İnfekteli bitkilerde tipik simptomlar sarılık, cadı süpürgesi, phyllody/virecense, geride doğru ölüm ve yaprak

bükülmesidir (Kumari ve ark., 2019). İnfekteli bitkilerde karetenoidlerin ve klorofilin yıkımıyla sararma semptomu çok fazla görülmektedir (Teixeira ve ark., 2020).

Daha önceleri fitoplazmaların tespiti için DAPI ve serolojik yöntemler kullanılsada son yıllarda bitki ve böceklerde fitoplazmanın saptanması için PCR kullanılmaktadır (Bertaccini ve ark., 2019). PCR yöntemi; DNA'nın izolasyonu, DNA'nın PCR ile çoğaltılması ve RELP analizi ile üç aşamadan oluşmaktadır (Zamharir ve ark., 2019).

Biberde sararma ve bodurlaşmaya; kerevizde ise yapraklarda beyazlaşmaya ve bodurluğa neden olan hastalık etmeninin '*Candidatus Phytoplasma solani*' ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Delić ve ark., 2016).

Avrupa ve Akdeniz'de biber, patates, mısır, asma, tütün ve kereviz gibi birçok bitkide '*Candidatus Phytoplasma solani*' yaygın bulunan fitoplazma etmenidir (Bertaccini ve ark., 2018).

Türkiye'de 2002-2004 yıllarında yapılan çalışmada susam, patlıcan ve biberin fitoplazma ile infekteli olduğu bulunmuştur. Bu etmenlerin RFLP analizleri ile 16SrVI-A grubundan olduğu ve domates iri tomurcuk fitoplazma etmeni ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Sertkaya ve ark., 2007).

Yılmaz ve ark. (2019), Adana, Mersin, Kahramanmaraş ve Şanlıurfa'da yaptığı çalışmada; biberde kloroz, bodurluk, boğum arası kısalığı ve küçük yaprak oluşumu gibi yaygın belirtilere sebep olan fitoplazma etmenini saptamak için geniş kapsamlı bir çalışma yapmıştır. Çalışma sonucunda Şanlıurfa'da elde edilen fitoplazmanın "*Candidatus Phytoplasma trifolii*" (16SrVI) ile %99 benzerlik gösterdiği ve 16SrVI-A altgrubundan olduğu saptanmıştır. Mersin'den alınan örnekler ise %96 "*Candidatus Phytoplasma asteris*" (16SrI) ile benzerlik olduğu saptanmıştır.

Fitoplazma ile enfekte olmuş bitkiler üzerinde yapılan bir çalışmada, fotosentez, protein, karbohidrat ve bitkinin savunmasında yer alan oksin, salisilik asit

ve jasmonik asit gibi sinyal yollarındaki değişimler araştırılmıştır (Dermastia ve ark., 2019).

Dünyada ve Türkiye’de küresel ısınma, nüfusun hızla artması, su kaynaklarının azalması ve yanlış tarım uygulamaları gibi sebeplerden dolayı kurak ve yarı kurak sahalarda toprağın tuz seviyesi önemli ölçüde artmakta ve bitkiler için büyük bir sorun haline gelmektedir (Gorji ve ark., 2017).

Toprak tuzlarının bitkilere zarar verecek seviyelerde tuz oranında artış yaşanmasının temel sebepleri; çözünebilir tuzların taban suyunun artması ile tuzlar buharlaşma ile toprağın üst katmanlarına çıkar ve toprakların tuzlulaşmasına neden olurlar (Okur ve Orçen. 2020).

Tuzluluk; bitkinin yaprak alanında azalmaya, kök ve gövdenin gelişiminin zayıflamasına, doku ve organlarında farklılaşmaya, meyve verim ve kalitesinde düşüşe neden olmaktadır (Arif ve ark., 2020).

Yüksek tuz stresi sonucu bitkide; ozmotik basıncın artmasıyla bitki su alımında sıkıntı yaşar ve bundan dolayı bitki beslenemez. Bitkide Na^+ ve Cl^- iyonlarının artmasıyla bitki besin elementlerini hücrelere ulaştıramadığından bitki metabolizmasını bozar. Hücre içi sıvının mineral yapısını ve Ca^+ dengesini bozar (Tanveer ve ark., 2020). Bu stres koşulları bitkilerde genellikle stomaların kapanmasına ve fotosentezin azalmasına yol açar. Stresin devam etmesi durumunda bitkinin büyümesi ve gelişimini tamamen durdurabilir (Byrt ve ark., 2018).

Topraktaki tuz; tohum çimlenmesi, fide büyümesi, enzim aktivasyonu, protein sentezi gibi metabolik faaliyetleri engelleyerek bitki büyüme ve gelişimini kısıtlamaktadır (Masonda ve ark., 2018).

Tuz stresi enzim sentezini olumsuz yönde etkilediğinden protein yapımı azalmakta ve bu durum bitkinin tüm metabolik faaliyetlerine yansımaktadır (Shah ve ark., 2021).

Tuz stresi nedeniyle yapraklarda azalan klorofil miktarı; bitkinin türü, stresin şiddeti ve süresiyle ilişkilidir. Stres altındaki bitkilerde klorofil oranı genellikle düşüş eğilimindedir (Najar ve ark., 2019).

Biber, tuz stresine orta derecede dayanıklılık gösteren bir bitkidir. Biber bitkisi, farklı gelişme dönemlerinde tuza karşı; orta hassas ve hassas toleranslı olduğu belirlenmiştir (Bora. 2015). Farklı biber çeşitlerinde; çimlenme ve fide döneminde yapılan tuz çalışmasında çimlenmenin yüzdesinin azaldığı ve çeşitler arasında tuza dayanıklılığın farklılık gösterdiği belirtilmiştir (Yıldırım ve Güvenç, 2006).

Bibere (*Capsicum annum*) uygulanan tuz (NaCl) stresi sonucu; bitkide prolin konsantrasyonunun arttığı fakat klorofil içeriğinin azaldığı belirlenmiştir (Abdelaal ve ark., 2019). Prolin, strese karşı dayanıklılık sağlayan, suda çözünebilir bir aminoasittir. Stres altındaki bitkilerde genellikle birikim oluşur (De Oliveira ve ark., 2020).

Prolin, tuz stresi altındaki bitki hücrelerinde en fazla ölçülen metabolittir. Hücrelerde stabilizasyonu, hidroksil radikallerinin düzenlenmesinde, sitozolik pH'nın ayarlanması ve ozmolit olarak görev yapan bir organik maddedir (Shafi ve ark., 2019).

Tuz genellikle bitki yapraklarında erken yaşlanmaya neden olmaktadır (Yeo ve ark., 1991). Yaprak yaşlanması genel olarak klorofil veya protein noksanlığı ve hücre zarı geçirgenliğinin artmasıyla meydana gelmektedir (Asad ve ark., 2019).

Tuz stresi sonucunda yapraklardaki erken yaşlanma malondialdehit (MDA) ile bağlantılıdır. Bitkide iyon birikiminin artmasıyla MDA miktarında da artış olmuştur. Çeltik bitkisinde yapılan bir çalışmada; tuza dayanıklı çeşitte MDA düşük oranlarda ölçülmüş fakat tuza duyarlı çeşitte ise yüksek değerlerde ölçülmüştür (Lutts ve ark., 1996). MDA molekülleri membranlarda doymamış yağ asitlerinin parçalanmasından oluşurlar. Stres koşulları altında arttığından MDA seviyesinin belirlenmesi, stres toleransının belirlenmesinde önemli bir yol göstericidir (Dolatabadian ve ark., 2008).

Börülceye tuz stresi (abiotik) ve börülce şiddetli mozaik virüsü (CPSMV) (biotik) eşzamanlı olarak uygulanan stresler, bitki türüne, patojene ve stres yoğunluğuna bağlı olarak patojenlere karşı artan veya azalan duyarlılıkla sonuçlanan, birbirine katkı maddesi veya antagonist olabilir. Fakat bu çalışmada tuz stresi CPSMV enfeksiyonuna duyarlılığı artmıştır (Varela ve ark., 2019).

Akkurak ve ark. (2022) '*Ca. Phytoplasma asteris*' etmeni ile infekteli marul bitkisinin fizyolojisinde ve biyokimyasal komponentlerindeki değişimleri incelemişlerdir. İnfekteli bitkilerde protein ve toplam klorofil miktarının azaldığını; MDA birikimi, Prolin, POX ve CAT enzim aktivitelerinin ise sağlıklı kontrol bitkilerine kıyasla artma eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir.

Ayvacı ve ark. (2022) '*Ca. P. aurantifolia*' fitoplazma etmeni ile infekteli yonca bitkisinin fizyolojisinde ve biyokimyasal parametrelerinde meydana gelen değişimleri araştırmışlardır. Çalışma sonucunda infekteli bitkilerde protein ve toplam klorofil miktarının kontrol bitkilerine kıyasla azaldığını; MDA birikimi, Prolin, CAT, POX, fenol, salisilik asit ve jasmonik asit içeriğinin ise infekteli bitkilerde arttığını rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitkisel materyaller

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji ve Fitopatoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Çalışmanın bitkisel materyalini Şanlıurfa ili biber yetiştirilen alanlardan toplanan biber bitkileri oluşturmuştur.

3.1.2. PCR ve RFLP çalışmaları için materyalin oluşturulması

Araziden toplanan ve fitoplazma ile bulaşık olduğu şüphelenilen biber bitkilerinden elde edilen total nükleik asitler PCR (Polymerase Chain Reaction) ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır. Direkt ve nested-PCR çalışmalarında kullanılan primerler Çizelge 3.1 de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR çalışmalarında kullanılan primerler

	DNA uzunluğu	Primerler	Referans
Direkt PCR	1.400 bp	R16F1 R16R0 R16F2n	(Lee ve ark., 1994) (Davis ve ark., 1997) (Lee ve ark., 1995)
Nested PCR	1.250 bp	R16R2	(Lee ve ark., 1995)

Toplamda 17 (*AluI*, *BfaI*, *EcoRI*, *BstUI*, *BamHI*, *DraI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaII*, *HinfI*, *HpaI*, *SspI*, *KpnI*, *RsaI*, *Sau3AI*, *MseI*, *HhaI* ve *TaqI* enzimleri) restriksiyon enzimi kullanılarak etmen *iPhyClassifier* yazılımı ile tanılanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin toplanması ve NaCl uygulamaları

Şanlıurfa ili biber yetiştirilen alanlarda fitoplazma ile bulaşık olduğu şüphelenilen ve sararma, bodurlaşma, çalılışma biçiminde simptom gösteren biber bitkileri kökünden sökülüp, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ne ait seralara getirilerek 1:1 oranında tof:perlit içeren saksılara transfer edilmiştir. Şüpheli biber bitkilerinden fitoplazma teşhisi için taze yaprak alınarak DNA izolasyonu yapıncaya kadar -20°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Deneme fitoplazma etmeni ile bulaşık olduğu belirlenen ve sağlıklı kontrol bitkileri üzerinde tesadüf parselleri deneme desenine göre dört grupta üç tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. Bu gruplar; a) kontrol, b) fitoplazma ile infekteli bitkiler, c) 100 mmol L⁻¹ NaCl uygulaması yapılan sağlıklı bitkiler, d) 100 mmol L⁻¹ NaCl uygulanan fitoplazma ile infekteli bitkiler. Her bir grupta yer alan bitkiler su ihtiyacına göre (2-3 gün ara ile) dört hafta boyunca su ve tuz çözeltisi içeren suyla sulanmıştır.

Deneme başlangıcı ve sonunda biber bitkilerinin yapraklarından örnekler alınan örnekler kese kağıtlarına konularak etiketlenip, -20°C'de biyokimyasal analizler yapıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA ekstraksiyonu çalışmaları

DNA ekstraksiyonu Ahrens ve Seemüller (1992) metodunda bazı değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır.

- a) İnfekteli bitkilerin, genç yaprak ve floem dokularından alınan örnekler (1 g örnek için 5 ml) CTAB buffer (%2 w/v cetyltrimethylammoniumbromide, 1.4 mol L⁻¹ NaCl, %0.22-β-mercaptoethanol, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl, %2 polyvinylpyrrolidone, pH 8.0) çözeltisi ile DNA ekstraksiyon poşetlerinde homojenize edilmişlerdir.
- b) Bu ekstraksiyondan 1 ml alınarak Eppendorf tüplere (1.5 ml) aktarılmış ve 5 dakika 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- c) Santrifüjlenen örneklerin supernatant kısımlarından 600 µl alınıp yeni Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonratüpler 65°C de 30 dakika su banyosunda inkubasyona bırakılmıştır.
- d) İnkubasyon sonrasında her bir tüpün içine 600 µl kloroform/izoamil alkol (24:1) eklenmiş ve karışım 1 dakika karıştırılmıştır.
- e) Daha sonra tüpler 10 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir (d-e aşamaları iki kez tekrar edilmiştir).
- f) Supernatant kısmından 300 µl alınmış ve yeni Eppendorf tüplere (1.5 ml) aktarılmış ve üzerine 300 µl isopropanol eklenerek 1 saat -20°C'de bekletilmiştir.
- g) Daha sonra tüpler 10 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiş.
- h) Üst kısım uzaklaştırılarak pellet %70'lik soğuk etil alkol ile yıkanarak santrifüj edilerek, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra pellet 50 µl

Tris-EDTA (1X) buffer ile çözdürülüp elde edilen total DNA'lar -70°C 'de moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.3. PCR çalışmalarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonlarının ayarlanması

PCR çalışmaları 200 μl 'lik Eppendorf tüplerinde 50 μl hacimde yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan total DNA miktarları nükleik asit izolasyonu sonucu elde edilen yoğunluk dikkate alınarak 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ olacak şekilde seyreltilmiştir. PCR ürünlerinin amplifikasyonu sırasında her primer 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ konsantrasyonunda kullanılmıştır.

Çalışma amacına uygun olan hedef bölgelerin çoğaltımı için gerekli olan ve 100'er mmol L^{-1} Deoksinükleotidtrifosfat (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)'lerden 20'şer μl alınarak 120 μl ddH₂O ilave edilmesi ile 200 μl ye tamamlanmıştır. Bu karışım sonucunda dNTP'ler 10 mmol L^{-1} konsantrasyonda PCR reaksiyonunda kullanılmıştır. DNA'in çoğaltılması sırasında kullanılan Taq DNA Polimeraz (5 ünite/ μl) enzimi 1,25 konsantrasyonda ve son olarak ddH₂O son hacmi tamamlayacak miktarda kullanılmıştır. PCR çalışmalarında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Konsantrasyon	Bir örnek (μl)
Distile su	-	40.75
PCR Buffer	10 x	5
Reverse primer	10 mM	1
Forward primer	10 mM	1
dNTP mix	10 mM	1
Taq DNA polimeraz	1.25 U/ μl	0.25
Total DNA	20 $\text{ng}/\mu\text{l}$	1
Toplam		50 μl

3.2.4. Hedef bölgelerin çoğaltılması (PCR)

Biber yaprak örneklerinden elde edilen total DNA'lerden PCR amplikasyonu direkt ve nested olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Direkt PCR'da 1400 bp ürün veren R16R1/R16R0 primer çifti, nested-PCR'da ise 1250 bp ürün için R16R2n/R16R2 primer çifti kullanılmıştır.

Örneklere uygulanan Termal Cycle programında 35 döngü içerisinde bulunan primerin tm (melting temperature) bağlanma sıcaklığı (annealing temperature) değeri dikkate alınarak uygulanmıştır. Direkt ve nested-PCR çalışmalarında kullanılan Termal Cycle döngüleri Çizelge 3.3 de verilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR kullanılan primerlerin çalışma koşulları

Primer	İlk Denatürasyon (1 döngü)	Denatürasyon	Primer Bağlanması (35 döngü)	Uzama	Son Uzama (1 döngü)
R16F1					
R16R0	95°C 3 dk	95°C 1 dk	Tm-5°C 2 dk	72°C 3 dk	72°C 10 dk
R16F2n					
R16R2	95°C 3 dk	94°C 1 dk	Tm-5°C 2 dk	72°C 3 dk	72°C 10 dk

Programlanması ayarlanan thermocycle cihazına PCR tüpleri konularak işlem başlatılmıştır. Direkt-PCR'da R16F1/R16R0 primerleri kullanılarak çoğaltılan ürünler 1/50 oranında sulandırılmış, bu çözeltilisinden 1 µl alınarak nested-PCR'da nükleik asit olarak kullanılmıştır.

3.2.5. Agaroz jel ve elektroforez çalışmaları

Galitelli ve Minafra (1994)'ya göre yapılan agaroz jel elektroforez çalışmasında PCR ile çoğaltılan DNA'ların kontrolü sağlanmıştır.

Sırası ile;

- Agaroz %1 olacak şekilde 80 ml 1xTris-Borik asit-EDTA buffer içinde çözdürülmüştür.
- Agaroz-TAE karışımı agaroz eriyinceye kadar mikrodalga fırınında ısıtılarak son hacim 80 ml olacak şekilde ayarlanmıştır.
- Karışım 60°C sıcaklığa ulaşınca kadar bekletilmiş ve daha sonra tarak geçirilen tank'a dikkatli bir şekilde dökülmüştür.
- Jel donduktan hemen sonra tarak dikkatlice çıkartılıp jel elektroforez tankına alınmıştır. Daha sonra, tank içi jel yüzeyini 1-2 mm geçecek şekilde 1X TAE ile doldurulmuştur.
- Elde edilen nested-PCR ürünlerinden 6 µl'lik örnek jeldeki kuyucuklara konulmuştur. İlk çukura 6 µl marker konulmuştur. Jel uzunluğu dikkate alınarak akım yönünde cm'ye 5 V akım ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- 80 dakikanın sonunda jel, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında ethidiumbromide (EtBr, 10 mg mL⁻¹) karışımı ile boyanmıştır ve daha sonra jel yüzeyindeki fazla ethidiumbromiden arındırmak için 10 dakika su içinde bekletilerek yıkanmıştır.

UV transilluminatör ile sonuçlar görüntülenmiştir.

3.2.6. Sanal (in silico) RFLP ve filogenetik ağaç analizleri

Fitoplazma pozitif bitkilerinden elde edilen 1250 bp'lik nested-PCR ürünlerinin iki yönde sekans dizileme işlemleri yapılmıştır (Sequencing – SeqScape® Software v2.7- MedSanTek laboratuvar malzemeleri San. ve Tic. Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye). Elde edilen iki yönlü diziler MEGAX programı kullanılarak

1250 bp'lik tek bir dizi haline getirilmiştir. Daha sonra bu diziler sanal RFLP çalışması için *iPhyClassifier* programı üzerinden toplamda 17 (*AluI*, *BamHI*, *SspI*, *HpaI*, *BfaI*, *Sau3AI*, *BstUI*, *HhaI*, *DraI*, *EcoRI*, *HpaII*, *HaeIII*, *RsaI*, *HinfI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI* ve *TaqI*) restriksiyon enzimi kullanılarak bir fitoplazma etmenine ait olup olmadığını teyit edilmiştir (Zhao ve ark., 2009). Daha sonra MEGAX programında Neighbor-Joining metodu kullanılarak 43 fitoplazma grubu ile karşılaştırılma yapılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

3.3. Bitki Biyokimyasal Analizler

3.3.1. Klorofil analizi

Total, *a* ve *b* klorofil analizleri Arnon (1949) tarafından hazırlanan protokole göre yapılmıştır. Deneyde kullanılan biber bitkilerinden, yaklaşık 0.5 g yaprak örneği alınarak 5 ml aseton:su (% 80 v/v) çözeltilisinde homojenize edilmiş sonra filtre kağıdından süzülerek ışık görmeyen tüplerin içine alınmıştır. Okumalar spektrofotometre (Epoch-BioTek) kullanılarak klorofil *a* için 663.5 nm, klorofil *b* için 645 nm de gerçekleştirilmiştir. Blank %80 asetona karşı yapılarak spektrometrisi yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formüllere göre mg/l taze ağırlık olarak hesaplanmış ve sonrasında mg g⁻¹ yaş ağırlık olacak şekilde ifade edilmiştir.

Aseton ekstratlarında klorofil konsantrasyonunun hesaplanması;

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

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

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

3.3.2. Prolin analizi

Bates ve ark. (1973)'nin hazırlamış olduğu protokole göre prolin içeriği belirlenmiştir. Çalışmada, 1.25 g ninhydrin 30 ml glacial asetik asit ve 20 ml 6 mol L⁻¹ fosforik asit karışımı kullanılmıştır (karışım 24 saat 4°C de stabil kalabilmektedir). Yaklaşık 0.5 g taze yaprak örneği alınarak sıvı azot içinde ezildikten sonra %3'lük 10 ml sulfosalisik asitte homojenize edilmiştir. Filtre kağıdından (Whatman No:1) geçirildikten sonra 2 ml olarak elde edilen karışımın içine 2 ml'lik asit-ninhydrin çözeltisi ilave edilmiş ve 1 saat 100°C de kaynatılmıştır. Daha sonra buz içerisinde alınarak soğutulan karışıma 5 ml toluen eklenerek 30 saniye vortex edilmiştir. Karışımda iki fazın oluşması için bir süre beklenmiştir. Üst kısımda oluşan faz mikropipet ile alınarak spektrofotometre (Epoch-Bio Tek) cihazında absorbans değeri saf toluen kontrolüne karşı 515 nm dalga boyunda okutulmuştur. Sonuçlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanan L-prolin solusyonu ile kıyaslanarak kalibre edilmiş ve µmol/g olarak ifade edilmiştir.

3.3.3. Lipit peroksidaz (MDA) analizi

Sariam ve Saxena (2000) metoduna göre yapılmıştır. Bitkilerde lipit peroksidasyon malondialdehit (MDA) olarak da ifade edilir. Yaklaşık 0.5 g taze yaprak örneği, 10 ml %0.1'lik triklor asetik asit (TCA) ile homojenize edilmiş ve 10000 g'da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında 1 ml ekstrakt alınıp, üzerine 4 ml'lik %5'lik tiobarbiturik asit (TBA) eklenmiştir. Elde edilen karışım 95°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve daha sonra buz içerisinde hızlı bir şekilde soğutulmuştur. Soğutma işlemi sonucunda tüpler tekrar 10000 g'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında iki faza ayrılan karışımın üst kısmı mikropipet kullanılarak alınmış ve spektrofotometre (EpochBio Tek) cihazında 532 nm ve 600 nm absorbans değerlerinde okumaları yapılmıştır.

Elde edilen veriler aşağıdaki formül kullanılarak MDA değeri hesaplanmıştır.

$$\text{MDA (nmol g}^{-1} \text{ fresh g.)} = [\text{Extraction volume (ml)} \times [(A_{532} - A_{600}) / (155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1})] / \text{Samplequantity (g)}] \times 10^3$$

3.3.4. Peroksidaz analizi (POX, E.C.1.11.1.7)

Cvikrova ve ark. (1994) tarafından kullanılan yönteme göre peroksidaz aktivitesi için yaklaşık 0.5 g yaprak örneği alınarak 10 ml 50 mmol L⁻¹ Na-fosfat çözeltisinde homojenize edilmiştir. Homojenize özden 100 µl alınarak üzerine 3 ml reaksiyon karışımı (13 mmol L⁻¹ guaiacol, 5 mmol L⁻¹ H₂O₂ ve 50 mmol L⁻¹ sodyum-fosfat, pH 6.5) ilave edilmiştir. Karışıma H₂O₂ eklenilerek reaksiyon başlatılmış ve spektrofotometre’de (EpochBio Tek) 470 nm’de 1 dakika ara ile 3 kez okuma yapılmıştır (25°C). Bir ünite peroksidaz aktivitesi ΔA_{470 nm}’de 0.1 absorbans/dakika olarak, sonuçlar ünite mg⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir.

3.3.5. Katalaz analizi (CAT, E.C.1.11.1.6)

Milosevic ve Slusarenko (1996) tarafından hazırlanan metota göre katalaz aktivitesi ölçülmüştür. Protokole göreyaklaşık 0.5g yaprak örneği alınarak 10 ml sodyum fosfat çözeltisinde homojenize edilmiş, elde edilen ekstraktan 50 µl alınarak üzerine 2.95 ml (10 mmol L⁻¹ H₂O₂, 50 mmol L⁻¹ Na-fosfat çözeltisi, 4 mmol L⁻¹ Na₂EDTA, pH 7.0) reaksiyon karışımına ilave edilmiştir. Reaksiyon işlemi başlatıldıktan hemen sonra spektrofotometre’de (Epoch-Bio Tek) 30 saniye içinde 240 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür (25°C). Bir ünite katalaz enzim aktivitesi ΔA_{240 nm}’de ünite mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır. Bir katalaz enzim ünitesi 1 dakika içinde 1 µmol H₂O₂’u parçalayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir (Wang ve Han, 2009).

3.3.6. Protein analizi

Protein analizi Bradford (1976)’a göre yapılmış, yaklaşık 0.5 g yaprak örneği 5 ml sodyum fosfat buffer (50 mmol L⁻¹, pH 7) içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra ele edilen bitki ekstraksiyonundan 100 µl alınarak üzerine Coomassie Brilliant Blue G-250 (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 alınarak 5 ml %95’lik ethanol ile çözüldürülmüştür) boyama çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra örnekler

spektrofotometrede (Epoch-Bio Tek) 595 nm'de okutulmuştur. Protein standart eğrisi için farklı konsantrasyonlarda (10-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) hazırlanan Bovine Serum Albumin Fraction V (Sigma) kullanılmıştır.

3.3.7. Fenol analizi

Shetty ve ark. (1995)'nin hazırlamış olduğu protokole göre fenol içeriği belirlenmiştir. Biber bitkilerinden yakшалık olarak 0,5 g taze yaprak örneği alınmış ve üzerine %80'lik metanol (100 ml için: 80 ml metanol+20 ml H₂O) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenize edilen ekstratlar filtre kâğıdı (Whatman No:1) kullanılarak süzölmüş ve falkon tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra 30 dakika süre ile 95°C sıcak su banyosunda inkulasyona ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. İnkübasyon işlemleri sonrasında ekstraksiyon örneklerinden 300 μl alınarak üzerlerine 1.5 ml Folin Coicalteau (1 ml Folin-C+9 ml H₂O, 1:10) ilave edilmiştir. Bu reaksiyon işlemleri başlatıldıktan 5 dakika sonra her bir örneğin üzerine %20'lik 1.2 ml Na₂CO₃ (100 ml H₂O+ 20 g Na₂CO₃) ilave edilmiştir. Daha sonra 40°C'de 30 dakika inkübasyon edilerek (Epoch-Bio Tek) 760 nm'de okutulmuştur. Kalibrasyon için farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış gallik asit standart eğrisi kullanılmıştır. Fenol içeriği mg GAE/g taze ağırlık olarak ifade edilmektedir.

3.3.8. Jasmonik asit analizi

Jasmonik asit analizi Annigeri ve ark. (2011)'e göre yapılmış, 1 g taze biber bitkisi yaprağı alınarak üzerine 10 ml etanol eklenmiş ve 12 saat boyunca oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında karışımlar filtre kâğıtlarından (Whatman No:1) süzölmüştür. Homojenize edilen karışımlardan 1 ml alınarak 323 nm'de spektrofotometre (Epoch-Bio Tek) cihazında okutulmuştur. JA konsantrasyonunun hesaplanmasında mutlak etanol içinde çözüldürölmüş farklı JA konsantrasyonlarından hazırlanan standart eğri kullanılmıştır.

3.3.9. Salisilik asit analizi

Salisilik asit analizi, Rainsford (2004) tarafından hazırlanmış olan metoda göre yapılmıştır. Öncelikle 1 g taze biber bitkisi yaprak örneği 10 ml etanol içinde 12 saat boyunca oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Homojenize olan çözelti daha sonra 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmından 100 µl alınıp %1'lik 2.9 ml ferrik klorür (FeCl₃) ile karıştırılmıştır. Karışımın toplam hacmi daha sonra reaksiyon karışımı ile 3 ml'ye tamamlanmıştır. Fe³⁺ iyonu ile SA arasında oluşan pembe renkli karışım spektrofotometre (Epoch-Bio Tek) cihazında 540 nm'de ölçülmüştür. SA içeriği etanol içinde hazırlanan 0-100 ppm arasındaki farklı SA konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Bunun sonucunda SA standart eğrisi oluşturulmuş ve buna göre hesaplamalar yapılmıştır. SA standartizasyon işleminde SA'ı çözen tüm çözücülerin kullanılabilmesi belirlenmiştir.

3.3.10. İstatistik analizi

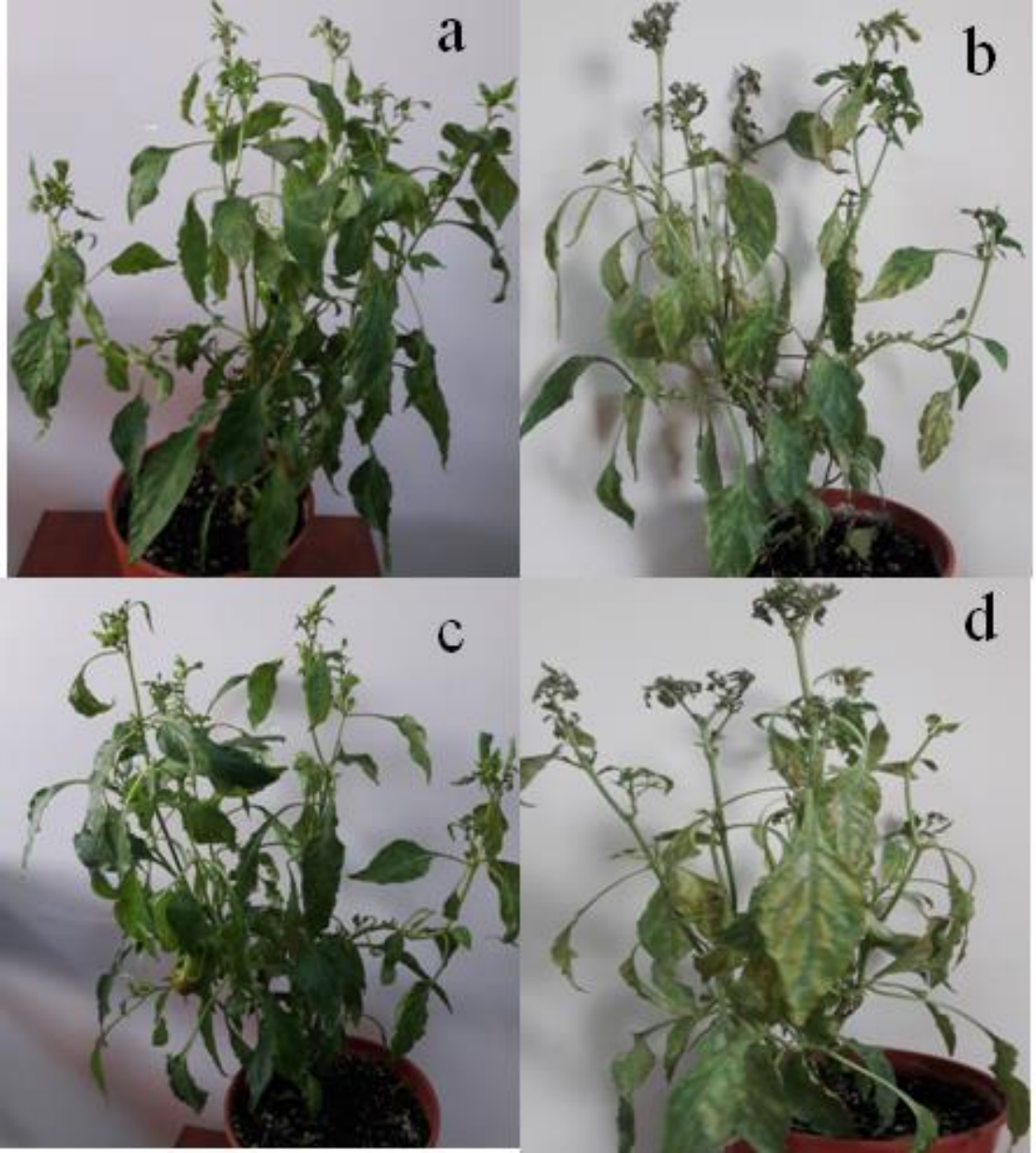
İstatistiksel analizler SPSS No. 23 ile varyans analizi (One-way ANOVA) ile düzenlenmiştir. Ortalamalarda bulunan farklılıklar Duncan's Multiple Range Test ile bulunmuştur. İstatistiksel olarak 0.05 (p<0.05) olan değerler önem arz etmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

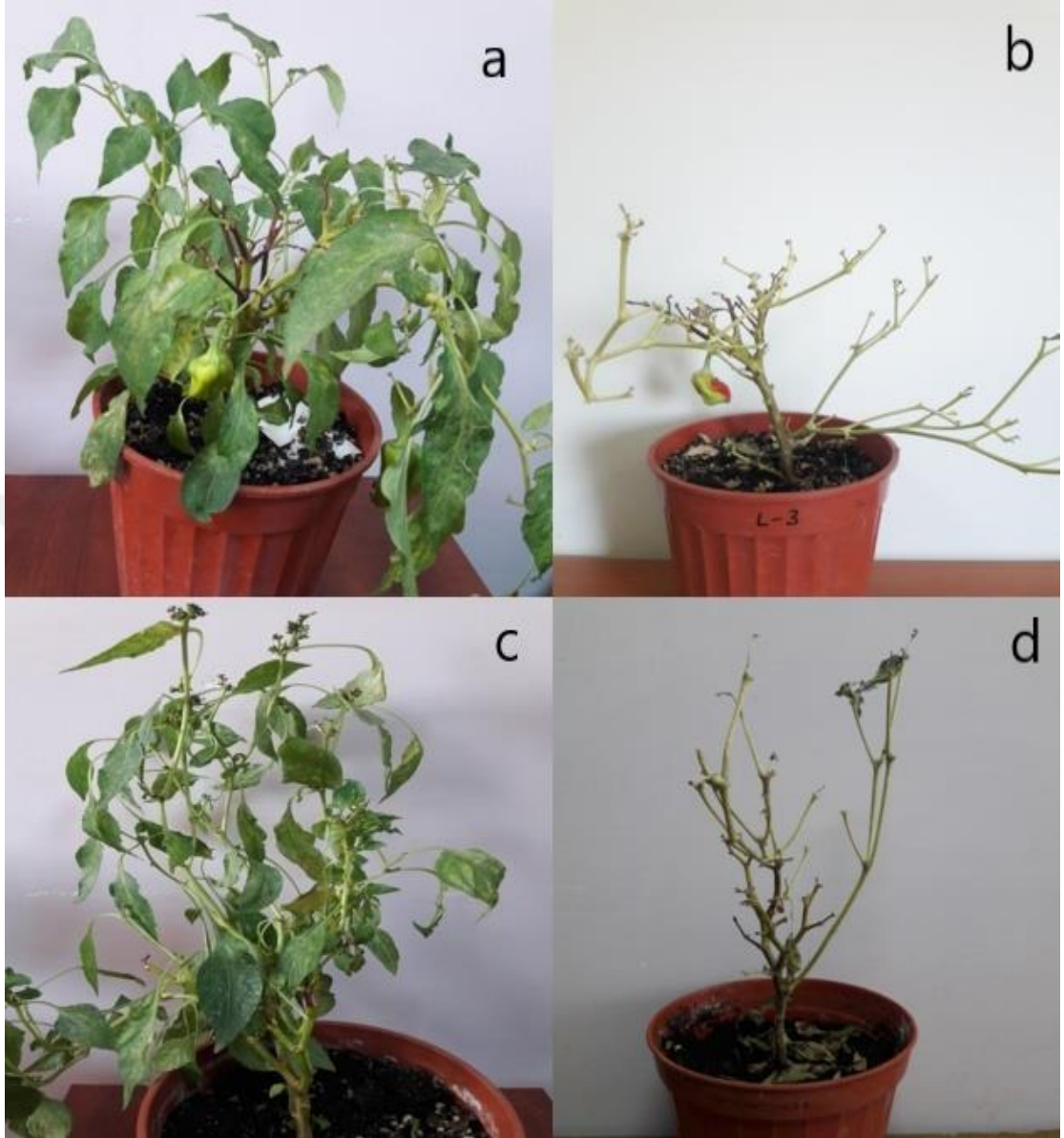
4.1. Survey Çalışmaları ve Örnekleme

Şanlıurfa ilinde biber yetiştiriciliği yapılan araziden şiddetli kloroz, sararma, küçük yaprak, birden fazla sürgün oluşumu, çalılışma gibi tipik fitoplazma belirtileri gösteren biber bitkileri kullanılmıştır. Bu bitkiler araziden kökleriyle birlikte sökülerek, bölüm serasında saksılara aktarılmıştır. Daha sonra bu biber bitkilerinden örnekler alınarak fitoplazmalı ile infekteli olup olmadığı moleküler yöntemler ile belirlenmiştir.

Fitoplazma ile infekteli ve sağlıklı bitkiler saksılara alındıktan sonra iki farklı sulama suyu (0 ve 100 mmol L⁻¹ NaCl) ile 4 hafta boyunca su ihtiyacına göre sulanmış, fitoplazma ve tuz stresine maruz kalan bitkiler ile bu stres faktörlerine ayrı ayrı maruz kalan bitkilerin durumu karşılaştırılmıştır. Bu bitkiler ayrıca, hiçbir stres faktörüne maruz kalmayan kontrol bitkilerine göre de kıyaslanmıştır.



Şekil 4. 1.Sağlıklı biber bitkisine tuz çözeltisi uygulamadan önce (a, c). Sağlıklı biber bitkisine tuz çözeltisi uygulandıktan bir ay sonrası (b, d).



Şekil 4 .2. Fitoplazma ile infekteli biber bitkisi tuz çözeltisi uygulamadan önce (a,c). Fitoplazma ile infekteli biber bitkisi tuz çözeltisi uygulandıktan bir ay sonrası (b,d).



Şekil 4. 3. a) Fitoplasma ile infekteli + NaCl ile muamele edilen bitki, b) NaCl ile muamele edilen bitki, c) Fitoplasma ile infekteli bitki, d) Kontrol

4.2. Moleküler Çalışmalar

4.2.1. Etmenin teşhisi ve PCR çalışmaları

Sera koşullarında kurulan denemede infekteli biberlerin yaprak ve yaprak orta damarlarından örnekler alınmış, PCR çalışmaları sonucunda fitoplazma hastalığı ile bulaşık oldukları teyit edilmiştir. Ayrıca sağlıklı bitkilerden alınan örneklerden de PCR yapılmış, bu bitkilerin hastalıktan ari oldukları belirlenmiştir.

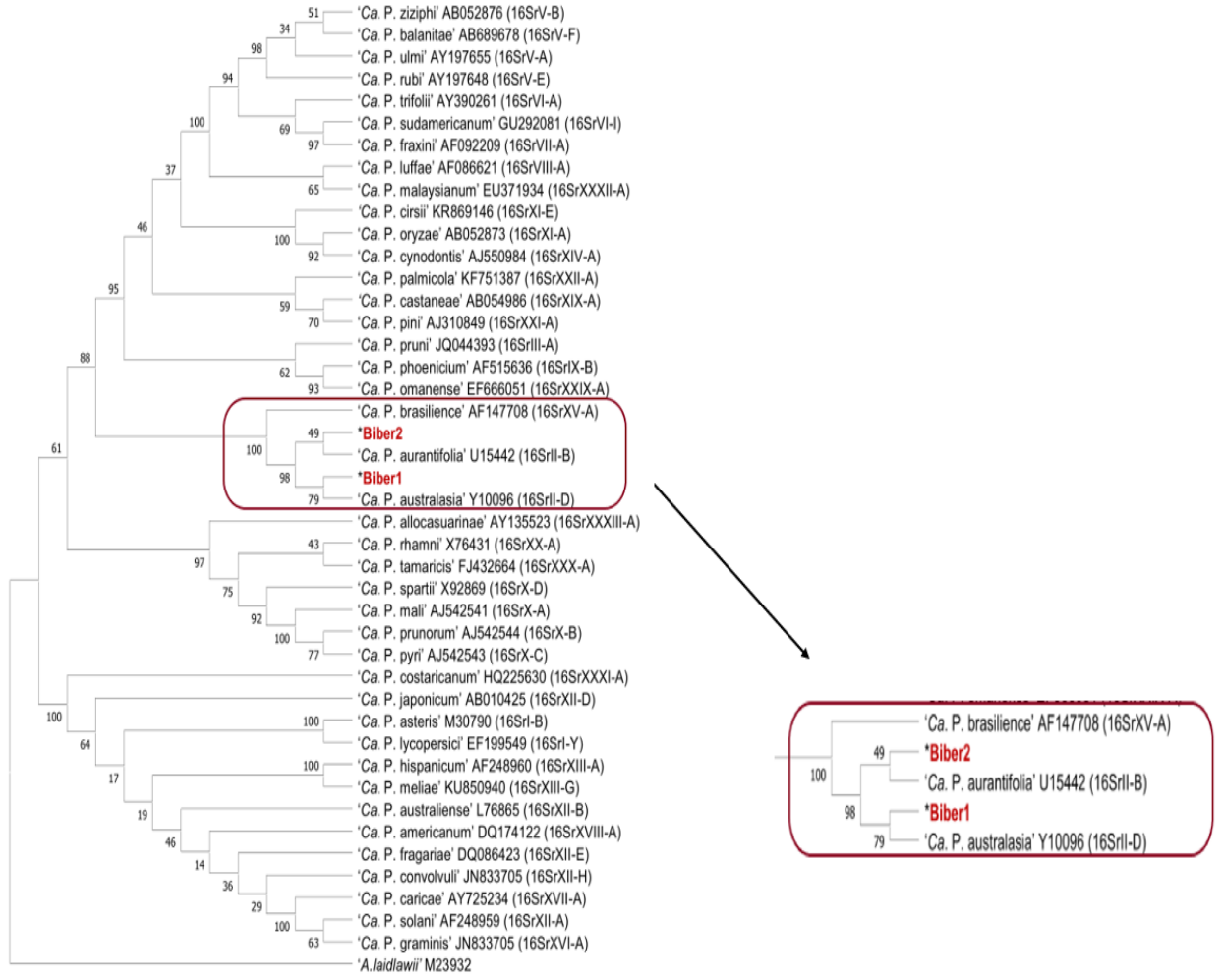
PCR amplifikasyon işlemi direkt-PCR ve nested-PCR olarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Direkt-PCR’da 1400 bp ürün veren universal R16F1/R16R0 primer çiftleri kullanılırken, nested-PCR’da ise 1250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. ‘*Ca. P. Aurantifolia*’ ile infekteli olduğu kesinleşen kaktüs bitkisi (*Opuntia* sp.)’nin DNA’sı pozitif kontrol (Ayvacı, 2020) olarak kullanılırken negatif kontrol için nükleaz içermeyen-su (ddH₂O) kullanılmıştır. Simptom gösteren biber bitkileri ve pozitif kontrolde beklenen düzeyde (1250 bp) bant gözlenirken; simptomsuz ve negatif kontrolde bant gözlenmemiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.4. Nested-PCR ürünlerinin görüntüsü (%1’lik agaroz jel). 11-17: fitoplazma ile infekteli biber bitkileri,18: Pozitif kontrol (GenBank Erişim Numarası: U15442); 20: Negatif kontrol; M: 1 bp marker.

4.2.2. Sekans analizi ve filogenetik ağaç

PCR çalışmaları sonucunda yaklaşık 1,250 bp bant veren R16F2n/R2 primerleriyle çoğaltılan ürünlerin hangi gruptan olduğunu belirlemek amacı ile Medsantek firmasına sekanslamaya gönderilmiştir. Sekanstan gelen örneklerin Forward ve Reverse dizileri Bioedit programı (Hall, 1999) kullanılarak birleştirilip tek bir dizi elde edilmiştir. Gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra MEGA7 (Kumar ve ark., 2016) programı kullanılarak dizi hizalanması (ClustalW) yapılmıştır. Dizileri GenBank'ta kayıtlı olan diziler ile karşılaştırmak için BLASTn yapılmıştır. Daha sonra bu dizilerden MEGA7 programı vasıtası ile filogenetik bir ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.5. Fitoplazma ile infekte olan biber bitkileri örnekleri 43 fitoplazma türünün 16SrRNA gen dizilemesine göre *neighbour-joining* metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç.

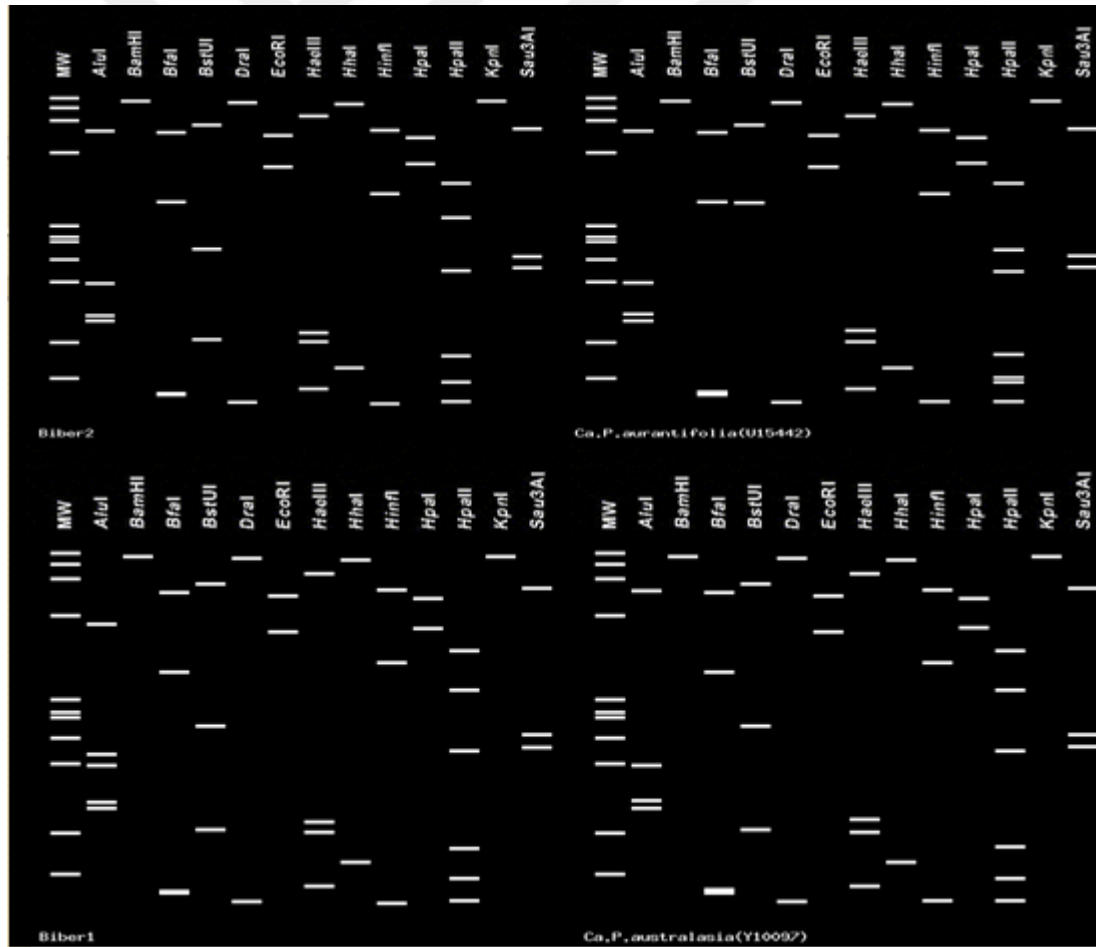
Filogenetik ağaçta belirtilen; biber 1 izolatının '*Candidatus Phytoplasma australasia*' ile %99 ve biber 2 bitkilerinin %99 benzerlik oranıyla '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; Hindistan'da sebze (marul, havuç ve Fransız fasulyesi) bahçelerinde görülen yaprak sararması, kloroz, küçük yaprak oluşumu gibi simptomlara 16SrII (*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*) ile %99 benzerlik gösteren bir patojenin neden olduğu rapor edilmiştir (Arocha ve ark., 2008). Diğer bir çalışmada, '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' Meksika ıhlamur ağaçlarında (*Citrus aurantifolia* L.) cadı süpürge hastalığının etmeni olduğu bildirilmiştir (Taheri ve ark., 2011). Başka bir çalışmada; İran'da phyllody, virescence, cadı süpürgesi, küçük yaprak ve sararma gibi belirtiler gösteren kirli hanım çiçeği bitkilerinde etmeninin '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' ile

%99 ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Hemmati ve Nikooel. 2017). Umman ve BAE’de yapılan çalışmada ise ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’nın neden olduğu cadı süpürge hastalığının limon ağaçlarında önemli bir fitoplazma hastalığı olduğu bildirilmiştir (Al-Ghaithi ve ark., 2017). Çin’de ise bodurluk, sararma, sürgünlerde çoğalma gibi tipik fitoplazma hastalık belirtileri gösteren domates bitkilerinde etmenin ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’ ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Dong ve ark., 2013). Meksika’da patateslerde kızarma gibi anormal renk değişimlerine yol açan cadı süpürgesi hastalığının da 16SrII ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’ grubu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Santos-Cervantes ve ark., 2008). Hindistan’da yapılan bir çalışmada biberde anormal çiçek gelişimi, sararma, küçülmüş yaprak ve boğumlar arası kısalan biberde ‘*Candidatus Phytoplasma australasia*’ ile %95 ilişkili olduğu beşirilenmiştir (Sharma ve ark., 2015). İranda domateste yapılan araştırmada 16SrII-D alt grubundan ‘*Candidatus Phytoplasma australasia*’ olduğu belirlenmiştir (Salehi ve ark., 2014).

4.2.3.Sanal (in silico) RFLP

Araştırmada fitoplazma tarafından pozitif olduğu tespit edilen ve F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan örneklerin dizileri 16Sr grubu/alt grubu sınıflandırmasına göre *in silico* RFLP analizi ile de teyit edilmiştir. *Phyclassifier* yazılımı kullanılarak benzerlik oranı tespiti için toplamda 17 restriksiyon enzimi (*Sau3AI*, *AluI*, *HpaII*, *BfaI*, *EcoRI*, *HhaI*, *BstUI*, *HinfI*, *RsaI*, *HpaI*, *DraI*, *KpnI*, *MseI*, *BamHI*, *HaeIII*, *TaqI* ve *SspI*) ile karşılaştırma yapılmıştır (Zhao ve ark., 2009).

Etmenin 16SrII-B ve 16SrII-D alt grubundan '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' ve '*Candidatus* Phytoplasma australasia' ile yakından ilişkili olduğu teyit edilmiştir. (GenBank erişim numarası; U15442, Y10097) (Şekil 4.4).



Şekil 4.6. F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan biber bitki izolatları ve 16SrII-B ve16II-D alt gruplarının kıyaslanması ile oluşturulan *in silico* RFLP görseli

Biyokimyasal analiz sonuçları

Çizelge 5. 1. 'Ca. Phytoplasma' ile infekte edilmiş biber bitkileri biyokimyasal parametreleri

	Top. Klo.	Klo.a	Klo.b	Fenol	Protein	Prolin	MDA	CAT	POX	JA	SA
10. gün	Kont.	0.77 ± 0.19 ^a	0.37 ± 0.09 ^a	0.40 ± 0.10 ^a	4.55 ± 1.89 ^a	0.38 ± 0.1 ^a	11.82 ± 2.24 ^a	28.05 ± 12.2 ^a	11.03 ± 3.18 ^a	3.57 ± 1.1 ^a	81.2 ± 8.95 ^a
	inf.	0.21 ± 0.1 ^b	0.30 ± 0.06 ^b	0.23 ± 0.01 ^b	3.58 ± 1.47 ^b	0.41 ± 0.4 ^a	12.5 ± 8.50 ^b	35.02 ± 5.36 ^b	8.58 ± 0.66 ^b	3.12 ± 0.53 ^b	69.55 ± 3.5 ^b
30. gün	Kont.	0.41 ± 0.06 ^A	0.23 ± 0.07 ^A	0.21 ± 0.035 ^A	4.44 ± 1.74 ^A	0.38 ± 0.10 ^A	10.09 ± 4.41 ^A	27.69 ± 4.61 ^A	10.7 ± 3.73 ^A	3.86 ± 0.2 ^A	58.33 ± 5.9 ^A
	inf.	0.41 ± 0.1 ^A	0.18 ± 0.08 ^A	0.20 ± 0.06 ^A	4.60 ± 2.86 ^A	0.39 ± 0.1 ^A	13.24 ± 2.60 ^B	27.96 ± 1.46 ^A	10.71 ± 3.60 ^A	4.59 ± 2.7 ^B	55.12 ± 3.40 ^A

Toplam klorofil (mg g⁻¹ taze ağırlık), klorofil *a* (mg g⁻¹ taze ağırlık), klorofil *b* (mg g⁻¹ taze ağırlık), fenol (mg GAE/g taze ağırlık), protein (µg/g taze ağırlık), prolin (µmol g⁻¹ taze ağırlık), MDA (nmol g⁻¹ taze ağırlık), CAT (ünite/mg protein), POX (ünite/mg protein), JA (mg JA/mg protein), SA (mg SA/mg protein) analizleri ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Top. Klo: toplam klorofil miktarı, Klo *a*: klorofil *a*, Klo *b*: klorofil *b*, kont.:kontrol, inf.:infekteli. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak p≤0.05 değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 5. 2. ‘Ca. Phytoplasma’ ile infekte edilmiş ve NaCl (100 mmol L⁻¹) sulama suyu ile sulanan biber bitkileri biyokimyasal parametreleri

	Top. Kloro.	Klo.a	Klo.b	Fenol	Protein	Prolin	MDA	CAT	POX	JA	SA	
10.gün	NaCl	0.7 ± 0.1 ^a	0.59 ± 0.29 ^a	0.40 ± 0.15 ^a	4.90 ± 0.67 ^a	0.41 ± 0.03 ^a	9.52 ± 0.94 ^a	25.15 ± 4.63 ^a	8.21 ± 0.70 ^a	4.02 ± 1.57 ^a	481.94 ± 79.50 ^a	56.66 ± 2.77 ^a
	inf. + NaCl	0.53 ± 0.25 ^b	0.30 ± 0.16 ^b	0.23 ± 0.09 ^b	5.45 ± 2.36 ^b	0.33 ± 0.09 ^a	23.97 ± 6.59 ^b	38.96 ± 4.90 ^b	12.38 ± 4.47 ^b	3.02 ± 1.1 ^b	404.05 ± 352.6 ^b	41.85 ± 1.23 ^b
30.gün	NaCl	0.22 ± 0.03 ^A	0.12 ± 0.03 ^A	0.16 ± 0.28 ^A	4.73 ± 0.42 ^A	0.41 ± 0.07 ^B	9.25 ± 2.84 ^A	23.62 ± 6.70 ^A	8.50 ± 1.36 ^A	4.35 ± 0.77 ^A	445.30 ± 76.81 ^A	41.66 ± 4.25 ^A
	inf. + NaCl	0.29 ± 0.21 ^A	0.24 ± 0.13 ^B	0.14 ± 0.08 ^A	4.88 ± 0.36 ^A	0.35 ± 0.1 ^B	15.57 ± 2.85 ^B	42.34 ± 7.30 ^B	11.75 ± 3.92 ^B	3.49 ± 1.28 ^B	399.33 ± 179.8 ^B	37.54 ± 3.11 ^B

Toplam klorofil (mg g⁻¹ taze ağırlık), klorofil *a* (mg g⁻¹ taze ağırlık), klorofil *b* (mg g⁻¹ taze ağırlık), fenol (mg GAE/g taze ağırlık), protein (µg/g taze ağırlık), prolin (µmol g⁻¹ taze ağırlık), MDA (nmol g⁻¹ taze ağırlık), CAT (ünite/mg protein), POX (ünite/mg protein), JA (mg JA/mg protein), SA (mg SA/mg protein) analizleri ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Top. Kloro: toplam klorofil miktarı, Klo *a*: klorofil *a*, Klo *b*: klorofil *b*, kont.: kontrol, inf.:infekteli. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak p≤0.05 değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir.

İnfekteli biber bitkilerinden elde edilen klorofil (toplam, *a* ve *b*), fenol, protein, prolin, MDA, CAT, POX, JA, SA parametreleri incelenmiş, infekteli bitkilerin klorofil değerleri kontrol grubundan daha düşük olduğu (10. gün, kontrol: 0.77 mg g⁻¹ taze ağırlık; infekteli: 0.46 mg g⁻¹ taze ağırlık) ve 30. günün sonunda her iki bitki grubunda klorofil içeriğinde yaşlanmaya bağlı olarak düşüş olduğu belirlenmiştir (kontrol: 0.41 mg g⁻¹ taze ağırlık; infekteli: 0.41 mg g⁻¹ taze ağırlık çizelge 5.1). Benzer durum, klorofil *a* ve *b* parametreleri içinde benzer bulunmuştur. Ancak 30. günün sonunda her iki bitki grubunun (kontrol ve fitoplazma infekteli) değerleri arasında fark görülmemiştir. Bu durumun doğal yaşlanmadan kaynaklanan klorofil degradasyonu, yani parçalanmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Benzer durum Ayvacı ve ark. (2022) tarafından yonca bitkisinde rapor edilmiştir. Fitoplazma ile infekteli bitkilerde tuz stresi daha önce çalışılmamış olduğu, ancak bitkilerin hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarına maruz kaldıklarında klorofil değerlerinin çok daha degrades olduğu her iki stres grubundan (patojen ve tuz stresi) daha fazla yıkıcı etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir (Dikilitas ve ark., 2020).

Bu çalışmada, NaCl stresi 10 gün sonra yıkıcı etkilerini artırırken 30 gün sonra hem infekteli hem de NaCl ile sulanan bitkilerde minimal düzeyde gerçekleşmiştir çizelge 5.2. Benzer şekilde klorofil *a* ve *b* değerleri de etkilenmiş hem NaCl hem de fitoplazma + NaCl stresi bitkide belirgin olarak azalmıştır.

Diğer bir yandan fenol, prolin ve MDA içerikleri 10. ve 30. gün sonunda 'Ca. Pyhtoplasma' ile infekteli ve sağlıklı bitkilerden alınan örnekler üzerinden ölçülmüştür. İlk ölçümler (10. gün) sonucunda prolin ve MDA değerlerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu (10. gün, prolin kontrol: 11.82 µmol g⁻¹ taze ağırlık; prolin infekteli: 12.5 µmol g⁻¹ taze ağırlık; MDA kontrol: 28.05 nmol g⁻¹ taze ağırlık; MDA infekteli: 35.02 nmol g⁻¹ taze ağırlık), 30. günün sonunda her iki bitki grubundaprolin ve MDA içeriklerinin kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir (30. gün prolin kontrol: 10.09 µmol g⁻¹ taze ağırlık; prolin infekteli:13.24 µmol g⁻¹ taze ağırlık; MDA kontrol: 27.69 nmol g⁻¹ taze ağırlık; MDA infekteli: 27.96 nmol g⁻¹ taze ağırlık çizelge 5.1). Ancak bu sonuçlar istatistiksel

olarak önem bulunmamıştır. Ayrıca 10. günün sonunda alınan örneklerde fenol ölçümünün kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir (10. gün fenol kontrol: 4.55 mg GAE/g taze ağırlık; fenol infekteli: 3.58 mg GAE/g taze ağırlık), diğer yandan 30. günün sonunda alınan örneklerde kontrol grubuna kıyasla infekteli grubun fenol içeriği yükselmiş olduğu ancak istatistiksel olarak önemli bulunmadığı belirlenmiştir (30. gün fenol kontrol: 4.44 mg GAE/g taze ağırlık; fenol infekteli: 4.60 mg GAE/g taze ağırlık) ($p \leq 0.05$) (çizelge 5.1).

NaCl stresi ile muamele edilen sağlıklı ve '*Ca. Phytoplasma*'-infekteli bitkilerden alınan örneklerin prolin ve MDA içerikleri ölçülmüş kontrol ve '*Ca. Phytoplasma aurantifolia*'-infekteli bitkilerin prolin ve MDA içeriklerinde olduğu gibi benzer sonuçlar elde edilmiştir. MDA içeriğinin 30. günün sonunda alınan örneklerde minimal düzeyde artış olduğu ancak istatistiksel bir önemli bulunmadığı, diğer taraftan prolin içeriğinin 10. ve 30. gününden ve MDA içeriğinin 10. gününden alınan örneklerin ölçüm sonuçlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). NaCl stresi sonucunda 10. günde alınan örneklerin fenol içerikleri kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli azalma görülmüştür. Diğer yandan 30. günde alınan örneklerin fenol içerikleri ise kontrol grubuna kıyasla minimal bir artışın olduğu ancak istatistiksel olarak bir önemin olmadığı belirlenmiştir.

Bitkilerin protein içeriklerine bakıldığında ise 10. ve 30. günün sonunda alınan örneklerden yapılan ölçümlerde '*Ca. Phytoplasma*'-infekteli biber bitkilerinin kontrol bitkilere kıyasla önemli bir artışın olmadığı (çizelge 5.1) fakat '*Ca. Phytoplasma*'-infekteli biber ve kontrol bitkilerinin NaCl stresine maruz bırakıldıktan 10. ve 30. günün sonunda alınan örneklerden yapılan ölçümlerde kontrol grubuna kıyasla protein içeriğinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir ($p \leq 0.05$) (çizelge 5.2). Proteinler bitkilerde stres savunmasında koruyucu etkiye, stres etkilerini azaltmaya, hücresel bütünlüğün korunmaya ve hücre haberleşmesinde etkilidir (Huang 2006). Genellikle stres altında bulunan bitkilerde proteinlerin

biriktiği gözlenmiş ancak çalışmamızda infekteli bitkilerin NaCl ile muamelesi sonucunda protein oranlarında azalma olduğu belirlenmiştir. Bu durumun proteinden oluşan hücre zarının NaCl stresine maruz kaldıktan sonra hücre yapısının bozulmasından dolayı proteinin aktivitesini etkilediği düşünülmektedir (Huang 2006).

Diğer bir yandan çalışmamızda bitkilerin enzim aktiviteleri incelenmiştir. CAT aktivitesinin belirlenmesi için '*Ca. Phytoplasma*'-infekteli ve kontrol biber bitkilerinden 10. gün sonunda alınan örneklerden yapılan ölçümlerde CAT değerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı fakat 30. günün sonunda yapılan ölçümlerin ise kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir (çizelge 5.1). NaCl stresine maruz bırakılan '*Ca. Phytoplasma*'-infekteli ve kontrol biber bitkilerinden 10. ve 30. gününde alınan örneklerin kontrol bitkilerine kıyasla aralarında önemli istatistiksel bir farkın olduğu belirlenmiştir çizelge 5.2. POX aktivitesinde ise '*Ca. Phytoplasma*' infekteli ve kontrol biber bitkilerinden 10. günde alınan örneklerden yapılan ölçümlere göre kontrol bitkilerine kıyasla önemli bir fark olmamakla birlikte azalış göstermiştir (çizelge 5.1). Fakat 30. günde alınan örneklerden yapılan ölçümlerde ise kontrol bitkisine kıyasla arttığı belirlenmiştir. NaCl stresine maruz bırakılan '*Ca. Phytoplasma*'-infekteli ve kontrol bitkilerden 10. ve 30. günden alınan örneklerden yapılan POX ölçümlerinin sonucunda ise kontrol bitkisine kıyasla azaldığı belirlenmiştir ($p \leq 0.05$) (çizelge 5.2).

Hücrelerde, bitki büyüme düzenleyicileri olan jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) bitkilerin büyümesinde ve gelişiminde rol oynar. Bu iki fitohormon (JA ve SA) birçok abiotik ve biyotik strese karşı bitki savunmasında iletim yollarını uyaran bir sinyal molekülüdür (Raza ve ark. 2021; Khan ve ark. 2020; Baghizadeh ve ark., 2011). Çalışmada ayrıca savunma sisteminde önemli rol alan SA ve JA miktarları araştırılmıştır. Sonuç olarak '*Ca. Phytoplasma*'-infekteli ve kontrol bitkilerinden 10. ve 30. günün sonunda alınan örneklerden yapılan SA-JA ölçümlerine göre infekteli bitkilerin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca NaCl stresine maruz bırakılan '*Ca. Phytoplasma*'-infekteli ve kontrol bitkilerinden 10. ve

30. günde alınan örneklerden yapılan SA-JA ölçümlerin kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu belirlenmiştir (çizelge 5.2). NaCl stresi altında artması beklenen SA-JA oranlarının düşüşünün sebebinin fitoplazmaların iletim demetlerini tıkaması olarak değerlendirilmiştir. Benzer sonuçlar Kaya ve İnan (2017) tarafından da rapor edilmiştir.



5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Araştırmalar sonucunda tuz stresi ile muamele edilen fitoplazmalı biber bitkilerinde simptomların şiddetlenerek arttığı, bitkide geriye doğru ölümün hızlandığı gözlemlenmiştir.

Bitkide tuz stresinin veya patojenin varlığının ayrı ayrı bulunması durumunda bitkinin bu faktörleri tolere etme ihtimali daha yüksek iken bu faktörlerin birlikte bulunması tolere ihtimalini düşürmektedir. Ayrıca bu durum oluşan stres faktörleri ile mücadele süresini kısalmaktadır.

Çalışmada; fitoplazma etmeni ile bulaşık ya da bulaşma oranı yüksek olan biber bitkilerinin tuzlu topraklara ekiminin değerlendirilmesi gelecekteki çalışmalar için somut veriler sunmuştur.

Ayrıca tuzlu topraklarda fitoplazma ile bulaşık biber bitkilerinin tuz stresine karşı biyokimyasal tepkileri belirlenerek kültürel mücadeleye katkı sağlanmıştır.

Yaptığımız bu çalışma ile tuz oranı yüksek topraklarda fitoplazmalı ya da fitoplazma ile bulaşma oranı yüksek biber bitkilerinin bu alanlarda ekimiyle ilgili elimizde somut verilerin oluşmasını sağlamıştır. Bu alanda yapılacak çalışmalara temel oluşturacağı gibi tuzlu topraklara ve fitoplazmaya dayanıklı biber bitkilerinde yapılacak ıslah çalışmaları için de önemli veriler sunacaktır.

KAYNAKLAR

- ABDELAAL, K. A., EL-MAGHRABY, L. M., ELANSARY, H., HAFEZ, Y. M., IBRAHIM, E. I., EL-BANNA, M., and ELKELISH, A. 2019. Treatment of sweet pepper with stress tolerance-inducing compounds alleviates salinity stress oxidative damage by mediating the physio-biochemical activities and antioxidant systems. *Agronomy*, 10(1), 26.
- ACOSTA-MOTOS, J. R., ORTUÑO, M. F., BERNAL-VICENTE, A., DIAZ-VIVANCOS, P., SANCHEZ-BLANCO, M. J., and HERNANDEZ, J. A. 2017. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18.
- AHMAD, R., HUSSAIN, S., ANJUM, M. A., KHALID, M. F., SAQIB, M., ZAKIR, I., and AHMAD, S. 2019. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in plants under salt stress. In *Plant abiotic stress tolerance* (pp. 191-205). Springer, Cham.
- AKKURAK, H., GULDUR, M., and DIKİLİTAŞ, M. 2022. Biochemical alterations in lettuce (*Lactuca sativa* L.) infected with 'Candidatus Phytoplasma asteris' related strain (16SrI-B subgroup). *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 26(1), 15-24.
- AL-GHAITHI, A., AL-SADI, A., EL-HAMMADI, M., AL SHARIQI R., AL YAHYAI, R., AL MAHMOLI, I., CARVOLHO, C., ELLIOT, S. and HOGENHOUT, S., 2017. Expression of phytoplasma-induced witches broom disease symptoms in acid lime (*Citrus aurantifolia*) trees in affected by climatic conditions.
- ALMA, A., LESSIO, F. ve NIKEL, H. 2019. Fitoplazma vektörleri olarak böcekler: ekolojik ve epidemiyolojik yönler. *Fitoplazmalarda : Bitki Patojenik Bakterileri-II* (s. 1-25). Springer, Singapur.
- ALTUNLU, H. 2019. Tuzlu Koşullarda Mikoriza Uygulamasının Kıpça Biberde (*Capsicum Annuum* L.) Fide Gelişimi ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 56(2), 139-146.
- ANNIGERI, S., 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(2), 446-450.
- ANNIGERI, S., SHAKIL, NA, KUMAR, J., and SINGH, K. (2011). Jasmonate (Jasmonic Acid) yaprak spreyinin Kök-ur nematodu, *Meloidogyne incognita* ile enfekte olmuş domateslerde direnç üzerine etkisi. *Annals of Plant Protection Sciences*, 19 (2), 446-450.
- ARIF, Y., SINGH, P., SIDDIQUI, H., BAJGUZ, A., and HAYAT, S. 2020. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 64-77.
- ARNON, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1.
- ASAD, M. A. U., ZAKARI, S. A., ZHAO, Q., ZHOU, L., YE, Y., and CHENG, F. 2019. Abiotic stresses intervene with ABA signaling to induce destructive metabolic pathways leading to death: premature leaf senescence in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 256.

- AYVACI, H., GULDUR, M. E. ve DIKILITAS, M., 2022. Physiological and Biochemical Changes in Lucerne (*Medicago sativa*) Plants Infected with ‘*Candidatus* Phytoplasma australasia’-Related Strain (16SrII-D Subgroup). *The Plant Pathology Journal*, 38(2), 146-158.
- 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’ brom disease in *Opuntia* sp. in Turkey. *New Disease Reports*, 44(1), e12031.
- BAENAS, N., BELOVIĆ, M., ILIC, N., MORENO, D. A., and GARCÍA-VIGUERA, C. 2019. Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food chemistry*, 274, 872-885.
- BAGHIZADEH, A., and HAJMOHAMMADREZAEI, M. 2011. Effect of drought stress and its interaction with ascorbate and salicylic acid on okra (*Hibiscus esculentus* L.) germination and seedling growth. *The Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. 7(1): 55-65.
- BATES, L. S., WALDREN, R. P., and TEARE, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- BERTACCINI, A. 2021. Containment of phytoplasma-associated plant diseases by antibiotics and other antimicrobial molecules. *Antibiotics*, 10(11), 1398.
- BERTACCINI, A., and LEE, I. M. 2018. Phytoplasmas: an update. In *Phytoplasmas: plant pathogenic Bacteria-I* (pp. 1-29). Springer, Singapore.
- BERTACCINI, A., FIORE, N., ZAMORANO, A., TIWARI, A. K., and RAO, G. P. 2019. Molecular and serological approaches in detection of phytoplasmas in plants and insects. In *Phytoplasmas: plant pathogenic bacteria-III* (pp. 105-136). Springer, Singapore.
- BLUM, A. 1984. Breeding Crop Varieties For Stress Environments. *Critical Reviews In Plant Sciences*. Vol. 2: 199-238.
- BORA, M., 2015. Değişik vejetasyon dönemlerine kadar uygulanan farklı tuz konsantrasyonlarının biberde meydana getirdiği fizyolojik, morfolojik ve kimyasal değişikliklerin belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 92s, Tekirdağ.
- BRADFORD, A. A. (1976). Protein-boya bağlanması ilkesini kullanarak mikrogram protein miktarlarının miktar tayini için hızlı ve hassas bir yöntem. *Analitik biyokimya*, 72 (1-2), 248-254.
- BUI, E. N. 2017. Causes of soil salinization, sodification, and alkalinization. In *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*.
- BYRT, C. S., MUNNS, R., BURTON, R. A., GILLHAM, M., and WEGE, S. 2018. Root cell wall solutions for crop plants in saline soils. *Plant science*, 269, 47-55.
- CHEN, Y., QIU, Y., ZHANG, Z., ZHANG, J., CHEN, C., HAN, J., and LIU, D., 2020. Estimating salt content of vegetated soil at different depths with Sentinel-2 data. *PeerJ*, 8, e10585.
- CHOUDHARY, D. K., KASOTIA, A., JAIN, S., VAISHNAV, A., KUMARI, S., SHARMA, K. P., and VARMA, A., 2016. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. *Journal of plant growth regulation*, 35(1), 276-300.

- CHOUDHARY, D. K., KASOTIA, A., JAIN, S., VAISHNAV, A., KUMARI, S., SHARMA, K. P., and VARMA, A. 2016. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(1), 276-300.
- CVIKROVÁ, 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. *Physiologia Plantarum*, 91(2), 226-233.
- DE OLIVEIRA, D. F., LOPES, L. D. S., and GOMES-FILHO, E., 2020. Metabolic changes associated with differential salt tolerance in sorghum genotypes. *Planta*, 252(3), 1-18.
- DEJUCQ-RAINSFORD, N., and JEGOU, B. 2004. Viruses in semen and malegenitaltissues-consequences for there productive system and therapeuticperspectives. *Current Pharmaceutical Design*, 10(5), 557-575.
- DELIC, D., CONTALDO, N., LOLIC, B., MORAVCEVIC, D., BERTACCINI, A., 2016. First Report Of 'Candidatus Phytoplasma solani' In Pepper and CeleryIn Bosnia and Herzegovina.
- DERMASTIA, M., KUBE, M., and ŠERUGA-MUSIĆ, M., 2019. Transcriptomic and proteomic studies of phytoplasma-infected plants. In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-III* (pp. 35-55). Springer, Singapore.
- DIKILITAS, M., KOÇYIGIT, A. ve YIGIT, F., 2009. A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi. *African Journal of Biotechnology*, 8 (14): 3118-3127.
- DIKILITAS, M., SIMSEK, E., and ROYCHOUDHURY, A. (2020). Role of proline and glycine betaine in overcoming abiotic stresses. *Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: biochemical and molecular perspectives*, 1-23.
- DOI, Y., TERANAKA M., YORA K. and ASUYAMA H., 1967. "Mycoplasma or PLT-group-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom". *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33 (4): 259–266. doi:10.3186/jjphytopath.33.259.
- DOLATABADIAN, A., SANAVY, S. A. M. M. and CHASHMI, N. A., 2008. The effects of application of ascorbic acid (Vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidant and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. *J. Agronomy and Crop Science*, 931-2250.
- DONG, J., ZHANG, L., LI, W., BEATH, J. and ZHANG, Z., 2013. 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'-related strain associated with tomato yellow scald disease in China.
- EL MOUKHTARI, A., CABASSA-HOURTON, C., FARISSI, M., and SAVOURÉ, A., 2020. How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development?. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1127.
- EL-ESAWI, M. A., ELANSARY, H. O., EL-SHANHOREY, N. A., ABDEL-HAMID, A. M., ALI, H. M., and ELSHIKH, M. S., 2017. Salicylic acid-regulated antioxidant mechanisms and gene expression enhance rosemary performance under saline conditions. *Frontiers in Physiology*, 8, 716.

- GHOSH, A., RAO, G. P., and BARANWAL, V. K., 2019. Manual on transmission of plant viruses and phytoplasmas by insectvectors. *Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, 110012*, 60.
- GORJI, T., SERTEL, E. and TANIK, A., 2017. Monitoring soil salinity via remote sensing technology under data scarce conditions: A case study from Turkey. *Ecological Indicators*, 74, 384-391.
- GURR, G. M., JOHNSON, A. C., ASH, G. J., WILSON, B. A., ERO, M. M., PILOTTI, C. A., and YOU, M. S., 2016. Coconut lethal yellowing diseases: a phytoplasma threat to palms of global economic and social significance. *Frontiers in plants science*, 7, 1521.
- HEMMATI, Ç. and NIKOOEI, M., 2017. Molecular characterization of a 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'-related strain associated with *Zinnia elegans* phyllody disease in Iran.
- HERNÁNDEZ-PÉREZ, T., GÓMEZ-GARCÍA, M. D. R., VALVERDE, M. E., and PAREDES-LÓPEZ, O., 2020. *Capsicum annuum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2972-2993.
- HOGENHOUT, S., OSHIMA K., AMMAR EI-D., KAKIZAWA S., Kingdom HN and Namba S., 2008. Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9: 403- 423.
- HUANG, B., 2006. Cellular Membranes in Stress Sensing and Regulation of Plant Adaptation to Abiotic Stresses, Plant-Environment Interactions, Published by CRC/Taylor and Francis, 416p.
- HUANG, L., 2020. Amelioration of salt induced toxicity in pearl millet by seed priming with silver nanoparticles (AgNPs): The oxidative damage, antioxidant enzymes and ions uptake are major determinants of salt tolerant capacity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 221-232.
- JI, L., LI, P., SU, Z., LI, M., and GUO, S., 2020. Cold-tolerant introgression line construction and low-temperature stress response analysis for bell pepper. *Plant signaling and behavior*, 15(7), 1773097.
- KAYA, A., ve İNAN, M. 2017. Tuz (NaCl) stresine maruz kalan reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinde bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine salisilik asidin etkileri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(3), 332-342.
- KHAN, N., BANO, A., ALI, S., and BABAR, M. 2020. Cross talk amongst phytohormones from plants and PGPR under biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 90(2), 189-203.
- KILIÇ, N., 2020. Şanlıurfa İli Biber Yetiştirme Alanlarında Bulunan Fitoplazmaların Yabancı Ot Konukçularının Belirlenmesi ve Karakterizasyonu. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi 45s.
- KRISHNAN, S., KUMARI, N., PANDEY, K. K., RAI, A., SINGH, B., and GANDHI, K., 2019. Phytoplasma in Vegetable Pathosystem: Ecology, Infection Biology, and Management. In *The Vegetable Pathosystem* (pp. 49-83). Apple Academic Press.

- KUMARI, S., NAGENDRAN, K., RAI, A. B., SINGH, B., RAO, G. P., and BERTACCINI, A. 2019. Global status of phytoplasma diseases in vegetable crops. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1349.
- KWON, O. K., MEKAPOGU, M., and KIM, K. S., 2019. Effect of salinity stress on photosynthesis and related physiological responses in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(6), 831-839.
- LEPKA, P., STITT, M., MOLL, E. and SEEMULLER, E., 1999. "Effect of phytoplasma infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 55, pp.59-68.
- LI, Y. 2009. Physiological responses of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*) to salt stress. *Modern Appl. Sci*, 3(3), 171-176.
- LUTTS, S., KINET, J.M., BOUHARMONT, J., 1996. NaCl-Induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.*, 78, 389-398.
- MAEJIMA, K., HASHIMOTO, M., HAGIWARA-KOMODA, Y., MIYAZAKI, A., NISHIKAWA, M., TOKUDA, R., and YAMAJI, Y. 2020. Intra-strain biological and epidemiological characterization of plum pox virus. *Molecular plant pathology*, 21(4), 475-488.
- MAEJIMA, K., OSHIMA, K. and NAMBA, S., 2014. "Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria", *Journal of General Plant Pathology*, vol. 80, issue 3, pp.210-221.
- MASONDO, N. A., KULKARNI, M. G., FINNIE, J. F., and VAN STADEN, J. 2018. Influence of biostimulants-seed-priming on *Ceratothera triloba* germination and seedling growth under low temperatures, low osmotic potential and salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 43-48.
- MAUST, B. E., ESPADAS, F., TALAVERA, C., AGUILAR, M., SANTAMARÍA, J. M., and OROPEZA, C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology*, 93(8), 976-981.
- MCLEOD, A. I., and LI, W. K. 1983. Diagnostic checking ARMA time series models using squared-residual autocorrelations. *Journal of time series analysis*, 4(4), 269-273.
- MILOSEVIC, N., and SLUSARENKO, A. J. 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(3), 143-158.
- MOUSTAFA-FARAG, M., ELKELISH, A., DAFEA, M., KHAN, M., ARNAO, M. B., ABDELHAMID, M. T., and AI, S., 2020. Role of melatonin in plant tolerance to soil stressors: salinity, pH and heavy metals. *Molecules*, 25(22), 5359.
- NAJAR, R., AYDI, S., SASSI-AYDI, S., ZARAI, A., and ABDELLY, C., 2019. Effect of salt stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Medicago truncatula*. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(1), 88-97.
- OKUR, B., and ORÇEN, N., 2020. Soil salinization and climate change. In *Climate change and soil interactions* (pp. 331-350). Elsevier.

- OPPEDISANO, T., PANASSITI, B., PEDRAZZOLI, F., MITTELBERGER, C., BIANCHEDI, P. L., ANGELI, G., and IORIATTI, C., 2020. Importance of psyllids' life stage in the epidemiology of apple proliferation phytoplasma. *Journal of Pest Science*, 93(1), 49-61.
- QIU, Z., GUO, J., ZHU, A., ZHANG, L., and ZHANG, M., 2014. Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 104, 202-208.
- RAINSFORD, K. D. (2004). *Aspirin and related drugs*. CRC Press.
- RAO, G. P., 2021. Our understanding about phytoplasma research scenario in India. *Indian phytopathology*, 74(2), 371-401.
- RAWAT, L., SINGH, Y., SHUKLA, N., and KUMAR, J., 2013. Salinity tolerant *Trichoderma harzianum* rain forces NaCl tolerance and reduces population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea (*Cicerari etinum* L.) under salt stress conditions. *Archives of phytopathology and plant protection*, 46(12), 1442-1467.
- 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(8), 1513-1541.
- SAIRAM, R. K., and SAXENA, D. C. 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 184(1), 55-61.
- SALEHI, E., SALEHI, M., TAGHAVI, S. M., and IZADPANH JAHROMI, K. (2014). A 16SrII-D Phytoplasma strain associated with Tomato Witches'-Broom in Bushehr province, Iran. *Journal of Crop Protection*, 3(3), 377-388.
- SANTOS-CERVANTES, M. E., CHÁVEZ-MEDINA, J. A., MÉNDEZ-LOZANO, J. and LEYVA-LÓPEZ, N. E., 2008. Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strain associated with pepper and tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Dis*, 92: 1007-1011.
- SEEMULLER, E., SCHAPER, U., and ZIMBELMANN, F., 1984. "Seasonal variations in the colonization patterns of mycoplasma-like organism associated with apple proliferation and pear decline", *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 91, pp.371- 382.
- SERTKAYA, G., MARTINI, M., MUSETTI, R., and OSLER, R., 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceae outcrops in Turkey. *Bull Insect*, 60: 141-142.
- SHAFI, A., ZAHOOR, I., and MUSHTAQ, U., 2019. Proline accumulation and oxidative stress: Diverse roles and mechanism of tolerance and adaptation under salinity stress. In *Salt Stress, Microbes, and Plant Interactions: Mechanisms and Molecular Approaches* (pp. 269-300). Springer, Singapore.
- SHAH, W. H., RASOOL, A., SALEEM, S., MUSHTAQ, N. U., TAHIR, I., HAKEEM, K. R., and REHMAN, R. U., 2021. Understanding the integrated pathways and mechanisms of transporters, protein kinases, and transcription factors in plants under salt stress. *International Journal of Genomics*, 2021.
- SHAKERI, E., MOZAFARI, A. A., SOHRABI, F., and SAED-MOUCHESHI, A., 2019. Role of proline and other osmoregulatory compounds in plant

- response to abiotic stresses. In *Handbook of Plant and Crop Stress, Fourth Edition* (pp. 165-173). CRC press.
- SHAMS, M., EKINCI, M., ORS, S., TURAN, M., AGAR, G., KUL, R., and YILDIRIM, E., 2019. Nitric oxide mitigates salt stress effects of pepper seedlings by altering nutrient uptake, enzyme activity and osmolyte accumulation. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(5), 1149-1161.
- SHAMS, M., YILDIRIM, E., ARSLAN, E., and AGAR, G., 2020. Salinity induced alteration in DNA methylation pattern, enzyme activity, nutrient uptake and H₂O₂ content in pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(4), 1-12.
- SHARMA, A., SHARMA, S., and KANG, S. 2015. First report of a new "Candidatus phytoplasma Australasia"-related strain in *Capsicum annuum* in India. *Journal of Plant Pathology*, 97(3).
- SHETTY, K., CURTIS, O. F., LEVIN, R. E., WIKOWSKY, R., and ANG, W. 1995. Prevention of Vitrification Associated with in vitro Shoot Culture of Oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Physiology*, 147(3-4), 447-451.
- TAHERI, F., NEMATZEDAH, G., ZAMHARIR, M., NEKOU EI, M., NAGHAVI, M., MARDI, M., and SALEKDEH, G., 2011. Proteomic analysis of the Mexican lime tree response to "Candidatus *Phytoplasma aurantifolia*" infection.
- TANVEER, K., GILANI, S., HUSSAIN, Z., ISHAQ, R., ADEEL, M., and ILYAS, N., 2020. Tuz stresinin domates bitkisine etkisi ve kalsiyumun rolü. *Bitki Besleme Dergisi*, 43 (1), 28-35.
- TEIXEIRA, A., MARTINS, V., FRUSCIANTE, S., CRUZ, T., NORONHA, H., DIRETTO, G., and GEROS, H. 2020. Flavescence dorée-derived leaf yellowing in grapevine (*Vitis vinifera* L.) is associated to a general repression of isoprenoid biosynthetic pathways. *Frontiers in plant science*, 11, 896.
- TRIPODI, P., RABANUS-WALLACE, M. T., BARCHI, L., KALE, S., ESPOSITO, S., ACQUADRO, A., and STEIN, N., 2021. Global range expansion history of pepper (*Capsicum* spp.) revealed by over 10,000 genebank accessions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(34).
- TRIVELLONE, V., and DIETRICH, C. H., 2021. Evolutionary diversification in insect vector-phytoplasma-plant associations. *Annals of the Entomological Society of America*, 114(2), 137-150.
- TÜİK., 2021. Türkiye İstatistik Kurumu .Bitkisel Üretim İstatistikleri.
- VARELA, A. L. N., OLIVEIRA, J. T. A., KOMATSU, S., SILVA, R. G. G., MARTINS, T. F., LOBO, A. K. M., and SILVEIRA, J. A. G., 2019. A resistant cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotype became susceptible to cowpea severe mosaic virus (CPSMV) after exposure to salt stress. *Journal of proteomics*, 194, 200-217.
- WANG, X., ZHOU, Y., XU, Y., WANG, B., and YUAN, F., 2021. A novel gene LbHLH from the halophyte *Limonium bicolor* enhances salt tolerance via reducing root hair development and enhancing osmotic resistance. *BMC plant biology*, 21(1), 1-16.
- WAŚKIEWICZ, A., MUZOLF-PANEK, M., AND GOLIŃSKI, P., 2013. Phenolic content changes in plant under salt stress. In *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* (pp. 283-314). Springer, New York, NY.

- YEO, A.R., LEE, K.S., IZARD P., BOURSIER, P.J., FLOWERS, T.J., 1991. Short and long-term effects of salinity on leafgrowth in rice (*Oryzasativa* L.). *J. Exp. Bot.*, 42:881- 889.
- YILDIRIM E, GUVENÇ I., 2006. Salt tolerance of pepper cultivars during germination and seedling growth. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 30(5):347-353.
- YILMAZ, S., ÇAĞLAR, B. K.andDJELOUAH, K., 2019. Molecular characterization of phytoplasma diseases of pepper in Turkey. *J Phytopathol*, 167:479–483. <https://doi.org/10.1111/jph.12820>.
- ZAMHARIR, M. G., MOZAFFARIAN, F., and HOSSEINI-GHARALARI, A. 2019. Molecular detection of grape decline phytoplasma in leafhopper species associated with infected grapevines in Iran. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 54(1), 25-34.
- ZHU, S. F., ZHAO, B. Q., HU, J. B., ZHANG, X. L. and ZHANG, C.L., 1998. Research progress and quarantine importance of phytoplasma. *Plant Quarantine*, 12: 237-240.