



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**N-AÇİL-HOMOSERİN LAKTON
MOLEKÜLLERİNİN HIYARDA (*CUCUMIS
SATIVUS* L.) BİTKİ GELİŞİMİ VE KONUKÇU-
PATOJEN İLİŞKİLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Sercan PAZARLAR

Bitki Koruma Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**N-AÇİL-HOMOSERİN LAKTON MOLEKÜLLERİNİN
HIYARDA (*Cucumis sativus* L.) BİTKİ GELİŞİMİ VE
KONUKÇU-PATOJEN İLİŞKİLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Sercan PAZARLAR

Danışmanlar: Dr. Öğr. Üyesi Nedim ÇETİNKAYA

(2. danışman) Prof. Dr. Melike BOR

Bitki Koruma Anabilim Dalı
Bitki Koruma Doktora Programı

İzmir
2019

Sercan PAZARLAR tarafından **DOKTORA** tezi olarak sunulan “N-Açıl-Homoserin Lakton Moleküllerinin Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) Bitki Gelişimi ve Konukçu-Patojen İlişkileri Üzerine Etkileri” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 25.06.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Dr. Öğr. Üyesi Nedim ÇETİNKAYA

Raportör Üye : Prof. Dr. Figen YILDIZ

Üye : Prof. Dr. Emin ONAN

Üye : Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Üye : Prof. Dr. Ömer ERİNCİK

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca ~~Yüksek Lisans Tezi~~ / Doktora Tezi olarak sunduğum “N-Açıl-Homoserin Lakton Moleküllerinin Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) Bitki Gelişimi ve Konukçu-Patojen İlişkileri Üzerine Etkileri” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

25/06/ 2019



Sercan PAZARLAR

ÖZET

**N-AÇİL-HOMOSERİN LAKTON MOLEKÜLLERİNİN HIYARDA
(*Cucumis Sativus L.*) BİTKİ GELİŞİMİ VE KONUKÇU-PATOJEN
İLİŞKİLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

PAZARLAR, Sercan

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Nedim ÇETİNKAYA

(II.) Prof. Dr. Melike BOR

Haziran 2019, 130 sayfa

Patojen ya da simbiyotik bakteriler ökaryotlar ile etkileşimleri sırasında grup aktivitelerini quorum algılama diye adlandırılan bir mekanizma ile düzenlerler. Birçok Gram negatif bakteri, N-açil-homoserin lakton moleküllerini iletişim için kimyasal sinyaller olarak kullanmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında hıyar (*Cucumis sativus L.*) bitkilerinin AHL moleküllerini tanıdığı ve bu moleküllere açıl zinciri uzunluğuna bağlı olarak cevap oluşturduğu ortaya konmuştur. N-hexanoyl-L-homoserin lakton (C6-HSL) primer kök uzamasını, N-3-oxo-decanoyl-L-homoserin lakton (oxo-C10-HSL) ise yanıl kök ve kök tüyü gelişimini teşvik ederek bitki büyümesini arttırmıştır. Uzun karbon zincirine sahip N-3-oxo-tetradecanoyl-L-homoserin lakton (oxo-C14-HSL) ile yapılan kök uygulaması *Pseudoperonospora cubensis* ve *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'a karşı bitki sistemik dayanıklılığını uyarmıştır. AHL molekülleri sekonder bir stres ortaya çıkana kadar bitkinin temel metabolizması üzerinde bir değişime neden olmamıştır. Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılan bitkiler *P. cubensis* ile inokule edildiğinde ön uygulama yapılmamış kontrol bitkilerine göre daha fazla kalloz, lignin ve hücre duvarı ilişkili fenolik bileşikler biriktirmiştir. Ayrıca priming uygulaması yapılan bitkilerde enfeksiyondan sonra H₂O₂, O₂⁻ birikiminde ve savunma ilişkili enzim aktivitesinde artış görülmüştür. Bu veriler AHL ilişkili savunmada hücre duvarının güçlendirilmesi gibi fiziksel ve savunma ile ilişkili enzimlerin birikimi gibi kimyasal savunma faktörlerinin görev aldığını göstermektedir. Gen ifadesi sonuçları, AHL ilişkili savunmanın hem SA hem de JA ilişkili olabileceğini göstermektedir

Anahtar sözcükler: N-açıl-homoserin lakton (AHL), uyarılmış dayanıklılık, *Pseudoperonospora cubensis*, mildiyö, hıyar



ABSTRACT**EFFECTS OF N-ACYL-HOMOSERINE LACTONES ON GROWTH
AND HOST-PATHOGEN INTERACTIONS IN CUCUMBER****(*Cucumis Sativus L.*)**

PAZARLAR, Sercan

PhD in Department of Plant Protection

Supervisors: Asst. Prof. Nedim ÇETİNKAYA

(II.) Prof. Dr. Melike BOR

June 2019, 130 pages

Pathogen or symbiotic bacteria interact with eukaryotes to regulate group activities by a mechanism called quorum sensing. Many gram negative bacteria use N-acyl-homoserine lactone molecules as chemical signals for communication. It is shown here that *Cucumis sativus* is able to sense AHLs and response depending on the length of acyl chain. N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) increased primary root elongation, and N-3-oxo-decanoyl-L-homoserine lactone (oxo-C10-HSL) enhanced plant root growth by promoting lateral root and root hair density. Treatment with long chain oxo-C14-HSL induced systemic resistance to *Pseudoperonospora cubensis* and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. AHL molecules did not effect plant metabolism until the occurrence of secondary stress. Oxo-C14-HSL pre-treated plants accumulated more callose, lignin and cell wall-associated phenolic compounds than that of untreated control plants when inoculated with *P. cubensis*. Moreover, AHL primed plants showed enhanced H₂O₂, O₂⁻ accumulation and defense related enzyme activity. The data shown here suggest that chemical factors such as accumulation of defense related enzymes and physical factors such as reinforcement of cell walls are involved in AHL-related plant defense. Gene expression data indicated that AHL-related defense might depend on both SA and JA metabolic routes.

Key words: N-acyl-homoserine lacton (AHL), induced resistance, *Pseudoperonospora cubensis*, downy mildew, cucumber

ÖNSÖZ

Artan dünya nüfusunun yeterli beslenme ihtiyacı ve sürdürülebilir yöntemlerle elde edilen güvenilir gıda kaynakları üzerine olan taleplerin artması günümüzde bitki koruma stratejilerini yönlendiren en önemli faktörlerdir. Yararlı mikroorganizmaların ya da onların metabolitlerinin kullanımı gibi biyolojik kontrol yöntemleri her geçen gün artmakta olan önemli bitki koruma yaklaşımlarıdır. Son yıllarda özellikle model bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar N-açil-homoserin laktonların priming molekülü olarak bitki savunma sistemini güçlendirdiği ve ayrıca bitki gelişimini teşvik ettiğini göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında AHL ilişkili bitki reaksiyonları ve mekanizmaları model bir bitki yerine tarımı yapılan bir kültür bitkisinde araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler, model sistemlerde elde edilen veriler ile paralellik göstermektedir. Bu durum AHL moleküllerinin bitki koruma ürünü olma potansiyelini göstermektedir.

Hıyar bitkisinin stres fizyolojisi ve genetiği hakkında sınırlı bilgiye sahip olmamız, ulaşılabilir mutant hatların olmaması gibi zorluklar özellikle gen ekspresyonu çalışmalarında çapraz kontrol yapmamızı engellemiştir. Ancak yine de elde ettiğimiz biyokimyasal parametreler çoğu zaman gen ekspresyon sonuçları ile desteklenmiştir.

İZMİR

25.06.2019

Sercan PAZARLAR





İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Priming Kavramı ve Bitki Patolojisindeki Örnekleri	5
2.2 <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (Berk. et Curt.) Rostov	9
2.3 Quorum Algılama (Quorum sensing, QS)	12
2.4 N-Açıl-L-Homoserin Laktonlar (AHLs)	14
2.4.1 AHL moleküllerinin bitki gelişimi ve performansı üzerine etkileri	16

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.2 AHL moleküllerinin bitki savunma sistemleri üzerine etkileri	21
2.4.3 Çeşitli bitki-bakteri ve bakteri-bakteri etkileşimlerinde meydana gelen farklı quorum algılama (QS) manipülasyon mekanizmaları	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi	28
3.1.1 Tohumların temini	28
3.1.2 Tohumların sterilizasyonu	28
3.1.3 Bitkilerin <i>in vitro</i> olarak yetiştirilmesi	28
3.1.4 Bitkilerin hidroponik olarak yetiştirilmesi ve optimizasyonu	28
3.2 Açıl Homoserin Lakton (AHL) Uygulamaları	29
3.3 AHL Uygulamalarının Kök Fenotipi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	30
3.4 AHL Uygulamalarının Bitkilerin Gelişimi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	30
3.4.1 İyon sızıntısı (Membran zararlanma indeksi)	30
3.4.2 Toplam klorofil içeriği	30
3.4.3 Lipit peroksidasyonu (MDA içeriği)	31
3.4.4 Fotosentetik verim (Fv/Fm)	31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.4.5 Büyüme parametrelerinin incelenmesi	31
3.5 Patojen İnokulasyonu ve Hastalık Çıkışının Belirlenmesi	32
3.5.1 Hastalık şiddeti üzerine AHL etkisinin değerlendirilmesi	32
3.5.2 AHL molekülünün <i>P. cubensis</i> virülensliği ve <i>Psl</i> poliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi	32
3.5.3 Kantitatif Real-time polimeraz zincir reaksiyonu ile <i>P. cubensis</i> yoğunluğunun belirlenmesi	33
3.6 Bitki Savunma Süreçleri ile İlgili Parametreler	33
3.6.1 Reaktif oksijen türlerinin histokimyasal olarak belirlenmesi	33
3.6.2 Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi	34
3.6.3 Toplam protein miktarının belirlenmesi	34
3.6.4 Peroxidaz (POX) aktivitesinin belirlenmesi	34
3.6.5 Fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesinin belirlenmesi.....	35
3.6.6 β -1,3-glukanaz aktivitesinin belirlenmesi	35
3.6.7 Fenolik bileşiklerin ve lignin içeriğinin belirlenmesi	35
3.6.8 Kalloz miktarının belirlenmesi	37
3.7 Savunma ve sinyalleşme ilişkili transkript değişim seviyelerinin belirlenmesi	37

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.8 İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR	41
4.1 AHL Moleküllerinin Fitotoksisite Açısından Değerlendirilmesi	41
4.1.1 İyon sızıntısı (Membran zararlanma indeksi)	41
4.1.2 Toplam klorofil içeriği	41
4.1.3 Lipit peroksidasyonu (Malondialdehit miktarı)	42
4.1.4 Fotosentetik verim (Fv/Fm)	42
4.2 AHL Uygulamalarının Bitki Büyümesi ve Gelişimi Üzerine Etkileri	43
4.2.1 Kök yapısı	43
4.2.2 Yaprak alan indeksi	49
4.2.3 Gövde yağ ağırlığı	49
4.2.4 Gövde kuru ağırlığı	50
4.3 AHL Uygulamalarının Bitki Savunma Sistemi Üzerine Etkileri	51
4.3.1 Hıyar mildiyösüne karşı sistemik dayanıklılığı uyaran AHL molekülünün ve dozunun seçimi	51
4.3.2 İnokulasyon sonrası bitkilerde <i>P. cubensis</i> yoğunluğunun belirlenmesi	53
4.3.3 Oxo-C14-HSL'nin <i>P. cubensis</i> virülensliği üzerine etkisi	53

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3.4 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 'a karşı Oxo-C14-HSL ile uyarılmış sistemik etkinin belirlenmesi	54
4.3.5 Oxo-C14-HSL'nin <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> proliferasyonu üzerine etkisi	55
4.3.6 Reaktif oksijen türlerinin histokimyasal olarak boyanması ve kantitatif H ₂ O ₂ miktarının belirlenmesi	56
4.3.7 İnfekteli dokularda kalloz birikiminin belirlenmesi	57
4.3.8 Bitkilerdeki fenolik bileşikler ve lignin içeriğinin belirlenmesi	58
4.3.9 Peroksidaz (POX), fenilalanin amonyal liyaz (PAL) ve β -1,3 glukanaz (GLU) aktivitesindeki değişimlerin belirlenmesi	59
4.3.10 Stoma hareketlerinin belirlenmesi	60
4.3.11 Savunma ve sinyalleşme ilişkili genlerin ifadesindeki değişimler	61
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR DİZİNİ	91
TEŞEKKÜRLER	129
ÖZGEÇMİŞ	130

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

2.1 <i>Pseudoperonospora cubensis</i> 'in hıyar bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler	10
2.2 AHL sinyalleşmesine dayalı bir hücrede oto-uyarıcı sinyal sistem	13
2.3 Temel oto uyarıcı moleküller	14
2.4 Çeşitli bitki-mikroorganizma etkileşimlerinde meydana gelen farklı quorum algılama (QS) manipülasyon mekanizmaları	26
3.1 Hidroponik olarak yetiştirilen hıyar bitkileri	29
3.2 AHL moleküllerinin kimyasal yapıları	29
4.1 AHL moleküllerinin membran permeabilitesi üzerine etkileri	41
4.2 AHL uygulamalarının toplam klorofil içeriği üzerine etkileri	42
4.3 AHL uygulamalarının yaprak MDA içeriği üzerine etkileri	42
4.4 AHL uygulamalarının Fotosistem II'deki maksimum kuantum verimi (Fv/Fm) üzerine etkileri	43
4.5 MS ortamında AHL moleküllerinin bitki kök yapısı ve gelişimi üzerine etkileri	44
4.6 MS ortamında AHL moleküllerinin kök tüyü yoğunluğu üzerine etkileri	45
4.7 AHL moleküllerinin yaprak alanı üzerine etkileri	47
4.8 AHL moleküllerinin gövde yaş ağırlığı üzerine etkileri (7. gün)	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 AHL moleküllerinin gövde yaş ağırlığı üzerine etkileri (14. gün)	49
4.10 AHL moleküllerinin gövde kuru ağırlığı üzerine etkileri (7. gün)	49
4.11 AHL moleküllerinin gövde kuru ağırlığı üzerine etkileri (14. gün)	50
4.12 Hastalık şiddetinin (<i>P. cubensis</i>) değerlendirilmesi	51
4.13 Oxo-C14-HSL ilişkili uyarılmış sistemik dayanıklılığın <i>P.cubensis</i> üzerine etkisi	52
4.14 Oxo-C14-HSL'nin <i>P. cubensis</i> virülensliği üzerine etkisi	53
4.15 Oxo-C14-HSL'nin hastalık şiddeti (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>) üzerine etkisinin değerlendirilmesi	54
4.16 Oxo-C14-HSL'nin <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> proliferasyonu üzerine etkileri	54
4.17 Oxo-C14-HSL uygulamasının H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkileri	55
4.18 Reaktif oksijen türlerinin histokimyasal olarak belirlenmesi	56
4.19 Oxo-C14-HSL'nin kalloz birikimi üzerine etkileri	57
4.20 Oxo-C14-HSL uygulamasının bitki fenol ve lignin içerikleri üzerine etkileri	58
4.21 Oxo-C14-HSL uygulamasının bitki savunma enzimleri üzerine etkileri	59
4.22 Oxo-C14-HSL uygulamasının stoma hareketleri üzerine etkileri	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.23 Oxo-C14-HSL uygulanan bitkilere ait salisilik asit ilişkili genlerin (*PR1*, *PR2*, *PAL*, *WRKY50*, *NPR1*) oransal mRNA ekspresyon düzeyleri 61
- 4.24 Oxo-C14-HSL uygulanan bitkilere ait jasmonik asit ilişkili genlerin (*LOX*, *COI1*) oransal mRNA ekspresyon düzeyleri 62
- 4.25 Oxo-C14-HSL uygulanan bitkilere ait *MAPK3* ve *RBOH* genlerinin oransal mRNA ekspresyon düzeyleri 62
- 4.26 Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılmış bitkilerde *P. cubensis* inokulasyonundan sonra salisilik asit ilişkili genlerin (*PR1*, *PR2*, *PAL*, *WRKY50*, *NPR1*, *ICS2*) oransal mRNA ekspresyon düzeyleri 64
- 4.27 Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılmış bitkilerde *P. cubensis* inokulasyonundan sonra jasmonik asit (*LOX*, *COI1*) ilişkili genlerin oransal mRNA ekspresyon düzeyleri 65
- 4.28 Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılmış bitkilerde *P. cubensis* inokulasyonundan sonra *MAPK3* ve *RBOH* genlerinin oransal mRNA ekspresyon düzeyleri 65

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Primer listesi	39
4.1 AHL moleküllerinin kök fenotipi üzerine etkileri	46



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
PTI	PAMP ile tetiklenmiş savunma
ETI	Efektör ile tetiklenmiş savunma
SAR	Sistemik kazanılmış dayanıklılık
ISR	Uyarılmış sistemik dayanıklılık
MIR	Mikoriza ile uyarılmış dayanıklılık
AI	Oto indüksiyon/oto uyarım
AHL	N-açıl-homoserin lakton
OH	Hidroksil
O	Oxo
QS	Quorum sensing- Quorum algılama
JA	Jasmonik asit
ET	Etilen
SA	Salisilik asit
BABA	β -aminobütirik asit
ABA	Absisik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Qol	Quinone dış engelleyiciler
CAA	Karboksilik asit amidler
R	Reseptör
Su	Substrat
HSL	Homoserin lakton
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
NO	Nitrik oksit
cGMP	Siklik GMP
3-O-C10-HL	N-3-oxo-decanoly-homoserine lactone
FAAH	Amid hidrolaz
GPCR	G-protein-bağlı reseptör
CaM	Kalmodulin
TFP	Trifluoperazine
W-7	N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide
W-5	N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide hydrochloride
C4	N-butanoyl

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
C6	N-hexanoyl
PR	Patojenisite ilişkili
C6-HSL	N-hexanoyl-L-homoserin lakton
Oxo-C10-HSL	N-3-oxo-decanoyl-L-homoserin lakton
Oxo-C14-HSL	N-3-oxo-tetradecanoyl-L-homoserin lakton
QQ	Quorum söndürme-Quorum quenching
<i>aiiA</i>	AI aktivasyonu için
PGPR	Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler
TBARS	Thiobarbitürik asit reaktif içeriği
TCA	Trikloroasetik asit
<i>Psl</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>
ITS	Internal ara bölge-Internal transcribed spacer
$O_2^{\cdot -}$	Süperoksit
NPR1	Non-expressor of pathogenesis related genes
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
NBT	Nitrotetrazolium blue chloride
PVPP	Polivinilpolipirolidon

BSA	Bovin serum albümin
POX	Peroksidaz aktivitesi
RBOH	Respiratory burst oxidase homologu
JAZ	JASMONAT-ZIM-DOMAIN
SCF	Skp-Cullin-F-box
COI1	CORONATINE INSENSITIVE1
LOX	Lipoksigenaz
ICS2	Isochorismate sentaz 2

1. GİRİŞ

Bitkiler, hareket edebilme özellikleri olmayan ve buna bağlı olarak potansiyel patojenler, zararlılar ya da olumsuz çevre koşullarından kaçamayan canlılardır. Mumsu yapıdaki kutikula, hücre duvarları ve fitoaleksinler gibi fiziksel ve kimyasal savunma mekanizmaları hayatta kalma açısından büyük önem taşımaktadır (Agrios, 2005). Bitkiler, patojen ilişkili moleküler motifleri (Pathogen-associated molecular patterns, (PAMPs)), hasar ilişkili moleküler motifleri (Damage-associated molecular patterns, (DAMPs)) ve efektör molekülleri algılamak için tanıma reseptörleri olarak da adlandırılan hücre dışı ya da hücre içi protein reseptörlerini ve dayanıklılık ilişkili proteinleri kullanarak kendilerini patojenlere karşı daha spesifik olarak savunabilirler. Bitki tarafından oluşturulan bu cevaplar PAMP ile tetiklenmiş savunma (PTI) ve efektör ile tetiklenmiş savunma (ETI) reaksiyonları olarak ortaya çıkabilmektedir (Dodds and Rathjen, 2010). Bağışıklık, bitkilerin bir saldırıya tepki olarak oluşturduğu uyarılabilir savunma mekanizmalarına dayanır ve patojenler de bu mekanizmaların üstesinden gelmeye çalışır.

Bitkilerin, PAMP'lara, efektörlere, bazı fiziksel veya kimyasal uyarıcılara ve/veya köklerde kolonize olan patojenik olmayan mikroorganizmalara maruz kalması, lokal ve sistemik olarak savunma yanıtları oluşturmaya neden olur. Bu yanıtlar genel olarak sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR), uyarılmış sistemik dayanıklılık (ISR) ve mikoriza ile uyarılmış dayanıklılık (MIR) olarak karakterize edilmektedir. Oluşturulan çok çeşitli savunma reaksiyonları, patojenleri kontrol altında tutmak için bitkilere olanak sağlamaktadır (Spoel and Dong, 2012).

Kültür bitkilerinde abiyotik ve biyotik stres toleransını arttırmaya yönelik farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Geleneksel ıslah yöntemleri ile dayanıklı ya da tolerant çeşitlerin geliştirilmesi gibi yaklaşımlar zaman alıcıdır. Genetik modifikasyonu yaklaşımı, her ne kadar kısa zamanda çok başarılı sonuçlar sağlayabilse de insan ve çevre sağlığı üzerindeki potansiyel riskleri nedeniyle birçok ülkede hâlâ kullanımına izin verilmemektedir. Alternatif olarak bitkiler, priming uygulamaları ile gelecekte karşılaşılabilecek biyotik ve abiyotik stres koşullarını daha başarılı bir şekilde tolere etmek için "hazırlanabilir" (Filippou et al., 2012). Priming kavramı, günümüzde genel olarak uyarılmış dayanıklılığın doğal bir parçası olarak kabul edilir. Bitki, potansiyel saldırganlara karşı savunma önlemleri alırken, savunma sistemini gelecekte daha hızlı ve/veya daha güçlü bir reaksiyon için alarm durumuna getirir. Ayrıca priming sadece patojenlere karşı

değil, aynı zamanda zararlılara (Frost et al., 2008; Kim and Felton, 2013) ve abiyotik streslere (Savvides et al., 2016; Caparrotta et al., 2018; Kollist et al., 2018) karşı da etkilidir.

Priming molekülüne maruz kalan bitkilerin metabolizmalarını değiştirmedeği ve bitkiye bir stres faktörü ulaşınca kadar gen ekspresyonunda bir değişiklik meydana gelmediği varsayılmaktaydı (Zimmerli et al., 2000; Zimmerli et al., 2001). Analitik çalışmalarda hızlı gelişmeler ve dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında kullanılan -omics tekniklerdeki ve bütüncül yaklaşımlardaki yenilikler, priming uygulamalarının bitkilerde arttırılmış savunma hareketleri için kritik öneme sahip değişiklikleri direkt olarak tetiklediğini göstermektedir (Balmer et al., 2015). Priming yönteminin bitkilerde savunma sistemini direkt etkilemesine rağmen gelişim ve enerji metabolizması üzerinde önemli bir etki oluşturmaması tohum ve meyve oluşumunu olumsuz olarak etkilememektedir. Priming uygulamalarının strese karşı arttırılmış savunma sağlamasının yanında, uyarıların bitki hafızasında metabolik olarak tutulması ve bitki enerji metabolizması üzerine yük olmaması nedeniyle bitki hastalıklarının kontrolünde 1930'lu yıllardan beri kullanılmaktadır. Düşük konsantrasyonlu salisilik asit (SA), benzothiadiazole, β -aminobütirik asit ve pipetik asit gibi birçok güçlü savunma uyarıcıları (ya da priming molekülleri) son yıllarda yoğun olarak çalışılmaktadır (Mauch-Mani et al., 2017).

Abiyotik ya da biyotik yüzeyler üzerinde, kolonilerde ya da bağımsız olarak yaşayan bakteriler, grup aktivitelerini düzenlemek için küçük moleküller üretirler (Kimyasal sinyaller). Bu sinyal molekülleri yapısal olarak çok düşük oranlarda sentezlenirler ve ortama salınırlar. Artan koloni yoğunluğu ya da ortam koşulları nedeniyle bu moleküllerin konsantrasyonları belirli bir sınıra ulaştığında, bir reseptör proteini/transkripsiyon faktörü konsantrasyonu algılamakta ve R proteini veya AI kompleksi ile ilgili genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır (Fuqua and Winans, 1994). Bu süreç oto indüksiyon/oto uyarım (AI) olarak isimlendirilmektedir (Nealson et al., 1970). Bu oto indüksiyon süreci çevresel ve fizyolojik sinyallerin algılanmasını ve bir hedef gen serisi ekspresyonunun optimize edilmesini sağlamaktadır. Bu anlamda genetik çeşitliliğin ve bakterinin kapasitesinin ifade edilmesi etkili bir şekilde organize edilebilmektedir. Oto uyarıcı moleküller quorum algılama (Quorum sensing, QS) mekanizmasının temelini oluşturmaktadır. Bu davranışsal olayların evrimsel önemi olduğundan, oto uyarıcı sistemler doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Bu sistemler yaygın moleküllerin salgılanması, patojenik sürecin ya da mutualistik dönemin

kapatılması gibi yüksek enerji gerektiren davranışların homeostatik kontrolünü garanti altına almaktadır. Bu mekanizmanın ana prensibi Hense and Schuster (2015) tarafından “itme-çekme” (push&pull) modeli olarak tanımlanmıştır.

Birçok Gram negatif bakteri popülasyonlar arası iletişim için N-açıl-homoserin laktonları (AHL) kullanmaktadır. Quorum algılama olarak adlandırılan, bakteriler arasındaki bu iletişim 40 yıldan uzun bir süre önce keşfedilmiştir (Kaplan and Greenberg, 1985). Açıl zincirinin uzunluğu (4-18 karbon arasında) ve zincirin γ konumundaki hidroksil (OH) veya oxo (O) grupları ile süstitüe edilmiş sayısız AHL türevi tanımlanmıştır (Williams, 2007). Günümüzde, AHL molekülleri aracılığı ile yürütülen quorum algılama mekanizmaları iyi bir şekilde ortaya konmuştur. AHL moleküllerinin bakteriler arasında iletişimi düzenlemesinin yanında alemler arası sinyal molekülleri olarak da çalıştığı ortaya konmuştur (Hughes and Sperandio, 2008). Yapılan çalışmalar aracılığıyla saflaştırılmış veya sentetik AHL'lere maruz bırakılan bitkilerin bu molekülleri tanımayı sağlayan sistemler aracılığı ile çevresindeki bakteri kolonilerinin varlığını ve aktivitesini algıladığı ve uygun cevapları düzenlediği ortaya konmuştur (Schikora et al., 2016; Hartmann et al., 2014).

Saflaştırılmış AHL moleküllerinin dışarıdan uygulanması veya AHL üretimi arttırılmış bakterilerin bitki gelişimi ve bitki savunma mekanizması üzerine önemli etkileri olduğu farklı monikotiledon ve dikotiledon bitkilerde gösterilmiştir. Ortamda AHL molekülleri bulunması durumunda bitkiler gen ekspresyonlarını ve protein profillerini değiştirmekte ve gelişimlerini modifiye etmektedir. AHL'lerin sistemik tepkilere yol açıp açmadığı ya da bitkiler içinde taşınıp taşınmadığı, AHL molekülünün yapısına ve özellikle de karbon zincirinin uzunluğuna ve dekorasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Bitkiler genellikle kısa zincirli AHL moleküllerine (C4-C6) büyüme oranında ve primer kök uzamasında artış (Bai et al., 2012), uzun zincirli AHL moleküllerine ise (C12-C14) dayanıklılığın uyarılması şeklinde cevap vermektedir (Schenk et al., 2014). Bitki bakteri etkileşimleri sırasında AHL moleküllerinin yanında bitkide savunma cevabı oluşturabilecek birçok PAMP bulunmaktadır (Boller and Felix, 2009). Bu nedenle AHL bileşikleri moleküler etkileşimin sadece bir bölümünü oluşturmaktadır. Ancak AHL moleküllerinin sentetik olarak üretilip, in vitro kültürlerde düşük konsantrasyonlarda teksele moleküller olarak denenmesi, bitki savunma ve gelişimi üzerindeki etkilerini açıkça ortaya çıkarmıştır.

Özellikle 21. yüzyılın başlarından bu yana insan ve çevre sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı sentetik pestisitlerin kullanımından kaçınma eğilimi

artmaktadır. Ancak pestisitlerin sahadaki sorunlara karşı çözüm üretmedeki etkinliği ve hızı göz ardı edilemeyecek bir gerçektir. Tarım endüstrisi hem doğrudan insan gıdası hem de endüstriye ham madde oluşturan bitkisel ürünlerin üretiminde istikrar sağlayabilmek için alternatif ve modern bitki koruma stratejileri geliştirmek zorundadır. Ayrıca, son yıllarda organik olarak üretilen ya da daha kontrollü kimyasala maruz kalmış ürünler üzerine olan talep artmaktadır. Tüm bu taleplerin karşılanması için bitki korumada biyolojik ajanların kullanımı umut vadeden bir stratejidir. Günümüzde *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Serratia* spp. gibi yararlı kök bakterileri, bitki hastalıklarının ve abiyotik streslerin kontrolünde kullanılmaktadır (Berg, 2009; Beneduzi et al., 2013). Benzer şekilde, bitki büyümesi veya sağlığı üzerinde etkisi olan mikrobiyal metabolitlerin bu konuda yüksek bir potansiyeli vardır. Başta AHL'ler olmak üzere QS molekülleri bu açıdan önemli adaylardır. Bu moleküllerin bitki gelişimi üzerindeki olumlu etkileri ve patojenlere karşı dayanıklılığı teşvik etme özellikleri günümüzde bitki koruma stratejilerinin arasına girme konusunda önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu çalışmanın temel amacı hıyar üretiminde en önemli biyotik stres faktörü olan hıyar mildiyösünün (*Pseudoperonospora cubensis*) mücadelesinde priming ajanı olarak AHL moleküllerinin kullanılabilme potansiyelini araştırmaktır. Farklı kimyasal özelliklere sahip AHL moleküllerinin değişen konsantrasyonlarda hıyar bitkisinin gelişimini ve mildiyö etmenine karşı savunma reaksiyonlarını nasıl etkilediğini belirlemek çalışmanın nihai amacını oluşturmaktadır.

Bu çalışma ana bölümden oluşmaktadır. Bunlardan birincisi, farklı karbon zinciri uzunluğuna sahip AHL moleküllerinin bitki gelişimi, kök fenotipi ve *P. cubensis*'e karşı bitki dayanıklılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. İkinci bölümde ise, çalışmanın ilk basamağında belirlenen molekül ve konsantrasyonun bitki savunması üzerindeki etkilerinin temelleri fizyolojik, moleküler ve biyokimyasal olarak ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Priming Kavramı ve Bitki Patolojisindeki Örnekleri

Bitkiler hayvanlardaki gibi özelleşmiş hareketli bağışıklık hücrelerine (T hücreleri) sahip olmadıkları için her hücre patojen saldırısını takiben aktif savunma cevapları geliştirme özelliğine sahiptir. Patojen ya da diğer stres faktörleri lokal hücreler tarafından algılanmakta ve bir çok karmaşık sinyal iletim mekanizmaları ile hücre içi ve sistemik sinyallere dönüştürülmektedir (Holeski et al., 2012). Bitkiler priming olarak adlandırılan bir mekanizma ile çevreden gelen tehlike sinyallerini (stres faktörleri) daha etkin tanınmasıyla savunma sisteminin duyarlılığını arttırarak savunma mekanizmalarını kuvvetlendirebilirler. Ön şartlandırma olarak da bilinen bu sistemde bitkiler uyarıcı moleküllere önceden maruz kaldıklarında sekonder streslere karşı hazır duruma geçerler ve stres faktörü ortaya çıktığında kendilerini daha hızlı ve daha etkili olarak savunabilirler (Pieterse et al., 2014; Martinez-Medina et al., 2016). Bu nedenle priming ajanları, aynı stres koşullarında uyarılmamış bitkilere kıyasla daha yoğun, hızlı, erken ve hassas savunma cevapları oluşturulmasını sağlayacak dayanıklılık düzenleyicileri olarak çalışmaktadır (Hilker et al., 2016).

Priming, konukçu bitki ile faydalı organizmalar ya da virüsent/avirüsent patojenler arasındaki etkileşim sonucu ve doğal ya da sentetik bazı kimyasallarla temas sonucunda meydana gelebilir (Conrath et al., 2015). Böyle bir interaksiyon sonucu bitkiler, hücresel ya da organizmasal olarak yeniden programlanır ve interaksiyonun etkisini moleküler seviyede uzun bir süre hatırlar. Priming, bitki patojen interaksiyonlarının farklı aşamaları sırasında aktif uyarılmış savunma mekanizmalarını içerir. Bunlar fitohormonlar tarafından kontrol edilen, reaskiyonun erken dönemlerinde oluşturulan cevaplar olabileceği gibi kromatin modifikasyonu ve DNA metilasyonu gibi uzun süreli cevaplarda olabilir (Tenenboim and Brotman, 2016). Yapılan çalışmalar priming ile uyarılan reaksiyonların bitki biyokimyasal hafızasında uzun süre kalabileceğini ve hatta üreme sonrası bir sonraki generasyona bile aktarılabilceğini göstermektedir (Slaughter et al., 2012; Tabassum et al., 2017). Priming molekülleri ile uyarılmış bitki dayanıklılığının nesiller arası geçişi epigenetik mekanizmaların işin içinde olabileceğini işaret etmektedir (Slaughter et al., 2012). Söz konusu moleküller ile uyarılan dayanıklılık, uyarılmış sistemik dayanıklılık (ISR), sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) ya da diğer dayanıklılık mekanizmaları aracılığı ile ortaya çıkmaktadır (Pieterse et al., 2014). SAR, infekte edilmemiş dokulara sinyal

iletmek ve savunmayı uyarmak için NPR1 proteinin görev aldığı salisilik asit ile ilişkili reaksiyonları içerir. ISR ise patojen olmayan yararlı mikroorganizmalar tarafından uyarılır ve sinyal iletim mekanizmaları jasmonik asit (JA) ve etilen (ET) ile ilişkilidir. Genel kanı bu iki yolağın sorumlu hormonları olan SA ve JA/ET'in birbirinin antagonisti gibi çalıştığı ise de yapılan çalışmalar uyarılmış dayanıklılık mekanizmalarında bu yolakların birlikte de çalışabileceğini göstermektedir. Bu mekanizmaların biyokimyasal ve moleküler detayları hala tamamen bilinmiyor olsa da biyolojik metodolojilerdeki gelişmeler daha derin ve tekrar edilebilir veriler üretmemizi sağlamaktadır (Gozzo and Faoro, 2013).

Uyarılmış dayanıklılık mekanizmaları, sistem içerisinde görevli proteinlerin ve diğer moleküllerin biyokimyasal olarak karşılıklı iletişim kurmasını ve hücresel metabolizmanın yeniden düzenlenmesini kapsar. Uyarılmış bitkilerdeki metaboliklerde meydana gelen değişikliklerin profillerinin çıkarılması priming mekanizmalarını anlamamızı sağlayan önemli bilgiler sunmaktadır. Ortaya çıkan veriler, primer metabolizmanın yeniden programlanması ve sekonder metabolitlerin biyosentezinin, priming olaylarında yer alan karakteristik süreçler olduğunu işaret etmektedir (Tenenboim and Brotman, 2016; Pastor et al., 2014). Örneğin, β -aminobütirik asitin (BABA) *Arabidopsis thaliana*'da malat, oksoglutarat ve fumarat içeren trikarboksilik asit döngüsünde değişimlere ve oktadekanoik yolağı ile fenilpropanoid biyosentezinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Pastor et al., 2013). BABA ile priming yapılan bitkilerde yürütülen metabolomik analizler, şeker metanolizmasının etkilendiğini, hücre duvarı yapısının yeniden düzenlendiğini ve şikimik asit (shikimate pathway) türevlerinde değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir. Bu metabolik yeniden düzenlenme aminoasit profillerinde spesifik değişikliklere ve kamaleksinin, indol-asetik asit ve indol-3-karboksaldehit birikimine neden olmuştur (Gamir et al., 2014). Benzer şekilde, patojen ilişkili moleküler bir motif olan bakteriyel lipopolisakkarit ile uyarılmış *Arabidopsis* bitkilerinde kamaleksinin, indol-glukosinolatlar, indol-3-karboksilik asit ve indol-asetik asit gibi triptofan türevi indolik metabolitlerin önemli değişimler gösterdiği bildirilmiştir (Finnegan et al., 2016). Kültüre alınmış tütün hücrelerine farklı priming moleküllerinin (riboflavin, azelaik asit ve acibenzolar-S-methyl) ve patojen ilişkili uyarıcıların (flagellin, lipopokisakkaritler, kitosan) uygulanması farklı metabolik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur ve bunlar içerisinde erken dönemde fenilpropanoid yolağı ürünlerinin artması en dikkat çekici olanıdır. Priming moleküllerinin ortak olarak özellikle bu yolakta (fenilpropanoid metabolizması) etki göstermesi priming olaylarında sekonder metabolizmanın önemini göstermektedir (Mhlongo

et al., 2016). Diğer yandan priming etkisinin bir sonraki nesle aktarılmasının aminoasitler ve şekerler gibi primer metabolitlerin seviyeleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Pastor et al., 2014; Hilker et al., 2016). Patojenlerin karakteristikleri ile bitkinin etkilenen yolları arasında bir ilişki mevcuttur. Genel olarak biyotrof patojenler primer metabolizmayı ve SA sinyalleşmesini etkilerken, herbivor böcekler ve nekrotroflar ise JA/ET yolağı ile ilişkili sekonder metabolizmayı etkilemektedir (Gamir et al., 2014). Ancak bu yargıya uymayan çok sayıda örnek de mevcuttur. *Microbacterium* sp. 3J1 ile simbiyotik ilişki kurmuş biber bitkileri, kuraklık stresi ile karşılaştığında antioksidanların ve osmo koruyucuların üretimini içeren bir metabolik yeniden düzenleme ile direnç seviyelerini arttırmışlardır. Bu metabolik değişimler C ve N metabolizması arasında gerçekleşmiştir ve lignin öncülerinin, fenoliklerin, şekerlerin ve aminoasitlerin artışı ile sonuçlanmıştır (Vílchez et al., 2018). Başka bir çalışmada ektomikorizal fungus olan *Laccaria bicolor* ile kavak kökleri arasındaki interaksiyon sonucu yapraklarda transkripsiyonel ve metabolik yeniden düzenleme ile sistemik savunma mekanizmalarının aktive olduğu görülmüştür. Yapraklarda kitinazların, organik uçucu bileşiklerin, azot taşıyan bileşiklerin ve fenoliklerin artması gözlenen reaksiyonlar içerisinde (Kaling et al., 2018).

BABA, priming ajanları içerisinde en çok çalışılan ve en popüler olan moleküllerden biridir. BABA, protein olmayan bir aminoasittir ve bitki savunmasını uyardığı 50 yıldan fazla bir süredir bilinmektedir (Papavizas, 1964). BABA, virüsler, bakteriler, funguslar, fungus benzeri organizmalar, nematodlar ve artropodlar gibi birçok biyotik strese ve sıcaklık, soğuk, tuz stresi gibi birçok abiyotik strese karşı priming molekülü olarak bitki savunma cevaplarını güçlendirmektedir (Balmer et al., 2015; Koen et al., 2014). BABA ile uyarılmış bitki dayanıklılığı SAR özelliklerini taşımaktadır (Van der Ent et al., 2009). Zimmerli et al (2000), BABA ile yapılan priming uygulamasında *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı oluşan dayanıklılığın SA tarafından kontrol edildiğini ve NPR1 proteininin bu yolda çalıştığını göstermiştir. Ancak fungus benzeri organizma olan *Hyaloperonospora arabidopsis*'e ve nekrotrof fungus olan *Alternata brassicola*'ya karşı geliştirilen BABA ilişkili dayanıklılığın NPR1'den bağımsız olarak absisik asit (ABA) ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Ton et al., 2005).

SA'nın fonksiyonel bir homoloğu olan Acibenzolar-S-methyl (ASM) [benzo(1,2,3)tiyadiazol-7-karbotioik asit S-metil ester], en bilinen priming moleküllerinden bir tanesidir ve ticari olarak tarımda kullanımı mevcuttur.

Bitkilerde hidrolizle üretilen ASM'nin asidik türevi, domates bitkilerini *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı sistemik olarak korumuştur. Görülen koruma etkisi, ASM'nin ve asidik türevlerinin tamamen parçalanmasından sonra da devam ettiği için sistemik uyarılmış dayanıklılıkla ilişkilendirilmiştir (Scarponi et al., 2001). ASM, Almanya ve İsviçre'de 1996 yılında Syngenta firması tarafından buğdayda küllemeye karşı ruhsatlandırılmıştır ve günümüzde birçok ülkede farklı ticari formülasyonlarını bulmak mümkündür. ASM'nin ön ya da son uygulamalarının mango, çilek, domates, portakal ve muz gibi birçok farklı bitkide değişen hasat sonu patojenlerine karşı dayanıklılığı uyardığı kaydedilmiştir (Tang et al., 2010; Cao et al., 2010; Zhu et al., 2008). ASM ile uyarılmış bitkilerde reaktif oksijen türlerinin birikiminin, patojenisite ilişkili proteinlerin üretiminin ve fenilpropanoid yolağı ile ilişkili olarak ligninin, fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin artışı gözlenmiştir (Ge et al., 2012; Jin et al., 2009).

Vitaminler, enzim flavoproteinlerin kofaktörleri olarak görev yapar (Fischer and Bacher, 2006). Son yıllarda yürütülen çalışmalar vitaminlerin çeşitli bitkilerde dayanıklılığı uyardığını ortaya koymuştur (Dong and Beer, 2000). Riboflavinin farklı konukçularda bakteriyel ve fungal hastalıklara karşı priming molekülleri olarak çalıştığı bulunmuştur (Ahn et al., 2005). Enzim flavoproteinlerin bir kofaktörü olarak, riboflavin, ROS üretimini katalize ederek bitki savunma tepkilerini etkilemektedir. Aktif ROS birikimi, muzda *Fusarium oxysporum*'a ve *Brassica napus*'ta *Leptosphaeria maculans*'a karşı dayanıklılığı indüklediği bildirilen suda çözünür menadion sodyum bisülfidin (MSB) aktivitesini arttırmıştır (Borges et al., 2004). Riboflavine karşı oluşturulan priming cevapları artan lipoksigenaz (LOX) aktivitesine bağlı olarak JA metabolizması tarafından kontrol edilmektedir. LOX enzimleri, JA ve oksilipinlerin oluşumundan sonra oktadekanoik yolağının ilk basamaklarında görev alır (Azami-Sardoei et al., 2010). Bir başka vitamin olan tiaminin de bitki dayanıklılığını uyarmaktadır (Ahn et al., 2005). Tiamin glikoliz, pentoz fosfat yolağı ve trikarboksilik asit döngüsü gibi çok genel metabolik yollarda enzimatik kofaktör olarak çalışmaktadır (Goyer, 2010). Farklı model ve kültür bitkilerinde tiaminin PAL (fenilalanin amonyum liyaz) metabolizmasını ve savunma ilişkili genleri etkileyerek biotrof ve nekrotrof patojenlere karşı sistemik dayanıklılığı uyardığı bildirilmiştir (Malamy et al., 1996; Ahn et al., 2005; Boubakri et al., 2012). Quercetin vitamininin de priming molekülü olarak etki gösterdiği bilinmektedir (Jia et al., 2010).

Hekzanoik asit (Hexanoic acid, Hx) bitkilerde priming etkisi gösterilen bir başka moleküldür (Aranega-Bou et al., 2014). Köklerden Hx uygulamasının domatestte hem nekrotrof patojen olan *Botrytis cinerea*'ya karşı hem de hemibiotrof patojen olan *Pst*'ye karşı savunmayı tetiklediği bulunmuştur (Vicedo et al., 2009; Scalschi et al., 2013). Hx ile uyarılan bitkiler bir patojen ile karşılaştıklarında SA ve oksilipin yollarını aktive ederek kalloz birikimi gibi yapısal savunma faktörleri aracılığı ile kendilerini korudukları gösterilmiştir (Finiti et al., 2014). Hx aynı zamanda patojene ve onun yaşam şekline göre de spesifik cevaplar oluşmasına neden olur (Camañes et al., 2015).

Bu örneklerin dışında para-aminobenzoik asitin (Song et al., 2013), menadion sodyum bisülfidin (Borges et al., 2003), kitosanın (El Hadrami et al., 2010), bazı organik uçucu bileşiklerin (Huckelhoven, 2007), azelaik asitin (Jung et al., 2009) ve pipekolik asitin (Navarova et al., 2012) de bir priming molekülü olarak bitki savunma sistemlerini etkilediği literatürde mevcuttur.

2.2 *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov.

Cucumis, *Cucurbitaceae* familyası içerisindeki 118 cinsten bir tanesidir ve içerisinde 32 adet tür vardır. Hıyar (*Cucumis sativus* L.) ve kavun (*Cucumis melo* L.) ekonomik olarak en önemli üyeleridir (Call et al., 2012). *Cucumis* türlerini hastalandıran 45'ten fazla patojen bulunmaktadır. Dayanıklılık ıslahı çalışmaları daha çok bakteriyel köşeli yaprak lekesi (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*), mildiyö (*Pseudoperonospora cubensis*) ve külleme (*Sphaerotheca fuliginea*) hastalıklarına karşı yapılır. Bunlar içerisinde agresifliği ve zarar derecesi nedeniyle mildiyö hastalığı, hıyarın en önemli hastalığı olarak kabul edilmektedir (Lebeda and Schwinn, 1994).

P. cubensis, *Cromista* alemine, *Heterokontophyta* şubesine, *Oomycetes* sınıfına, *Peronosporales* takımına, *Peronosporaceae* familyasına ve *Pseudoperonospora* cinsine bağlıdır (Voglmayr, 2008). Etmen ilk olarak Berkeley tarafından 1868 yılında Küba'dan toplanan bitki materyallerini içeren herbaryumda bulunmuştur ve bu nedenle tür adı *cubensis*'tir (Skalický, 1961). Hıyar mildiyösü bir yaprak hastalığıdır ve yaprağın üst yüzeyinde bazen nekrotik merkezlere sahip klorotik lezyonların gelişimi ile kolaylıkla farkedilebilir. Bu lezyonlar yaprak damarları tarafından sınırlandırılabilir ve böylece köşeli lekeler şeklinde görülebilirler (Şekil 2.1). Enfeksiyon ilerledikçe klorotik lekeler genişler ve nekrotik lekeler dönüşür (Oerke et al., 2006). Kuru ve sıcak havalarda

nekrotik lekelerin oluşması çok daha hızlı olmaktadır (Lebeda and Schwinn 1994).



© Sercan Pazarlar

Şekil 2.1 *Pseudoperonospora cubensis*'in hıyar bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

Enfeksiyon yapabilen primer eşeysiz üreme birimi zoosporlardır. Sporangium oluşumu için optimum sıcaklık 15-20°C'dir. Konukçu çeşidi, konukçunun fizyolojik durumu ve yaşı da sporulasyonu etkileyebilir (Cohen 1981). Sporangiumlar yumurta biçimli ya da eliptik şekildedir ve 15-25x20-35 µm kadardır (Choi et al., 2005). Olgunlaşan sporangiumlar açık gri ya da koyu mor renkte olabilirler. Rüzgârlı ve yağmurlu havalarda sporangiumlar kolaylıkla sporangioforlardan ayrılıp yayılabilirler. Yaprak yüzeyine ulaştıktan sonra çimlenebilmeleri için serbest suya ihtiyaç duyarlar. Çok çekirdekli protoplast farklılaşarak 8-12 µm boylarında sayıları 5 ile 15 arasında değişen tek kamçılı zoosporlara dönüşür (Palti and Cohen 1980). Zoosporlar hızlı bir şekilde stoma açıklıklarına doğru ilerler ve burada kamçılarını kaybedip kist haline dönüşürler (Cohen, 1981). Bu yapıdan bir çimlenme hifi oluşur ve daha sonra apresoryum oluşturulur. Apresoryumdan oluşan penetrasyon hifi stoma açıklıklarından yaprak dokusu içine girer (Cohen et al., 1981). Uygun çevre koşullarında ve duyarlı bir konukçuda patojenin kolonizasyonu çok hızlı olarak gerçekleşir ve 5 ile 7 gün arasında yaprağın alt yüzeyinde sporangioforlar ve yeni sporangiumlar oluşur. *P. cubensis*'in eşeyli üremesi çok nadirdir ve şimdiye kadar birçok ülkede bu durum kanıtlanamamıştır. Patojenin eşeyli üremesi *Perenosporaceae*'nin diğer üyelerinde olduğu gibi oospor oluşumu ile gerçekleşmektedir (Michelmor, 1981). Eşeyli üreme üretim sezonunun sonunda, enfekteli dokular nekroza uğradıktan sonra olmaktadır (Bedlan, 1989).

Hıyar mildiyösü, Avrupa'da özellikle 2000'li yılların başlarında büyük epidemiler yaparak yıllık %80'lere varan verim kayıplarına neden olmuştur ve bugün hem açık alan hem de sera yetiştiriciliğinde hıyarın en tehlikeli hastalığı olarak kabul edilmektedir (Urban and Lebeda, 2006). Etmenin mücadelesinde yoğun ilaçlama programları uygulanmaktadır. Ancak fungusit uygulamalarının fazlalığı üretim maliyetlerini arttırmaktadır. Sporangium tuzakları ve önceden tahmin uygulamaları ile elde edilen verilere göre alınan doğru ilaçlama zamanı kararları yüksek ilaçlama maliyetlerini ve çevreye verilen zararı düşürebilir (Holmes et al., 2004). Kimyasal kontrolün etkinliği *P. cubensis* popülasyonlarının fungusitlere dayanıklılık geliştirmesi ile azalmaktadır. *P. cubensis*, metalaxyl ve mancozeb etkili maddelerine dayanıklılık geliştiren ilk oomycete üyesidir (Reuveni et al., 1980; Thomas and Jourdain, 1992). Patojen tarafından, strobilurin grubu fungusitlere karşı da duyarlılık azalışı olduğu bilinmektedir (Heaney et al., 2000). Mefenoxam ve strobilurinlere karşı dayanıklı izolatların ABD'de yetiştiricilik yapılan arazilerde yaygın olduğu bildirilmiştir (Adams and Quesada-Ocampo et al., 2014; Hausbeck and Linderman, 2014). Ayrıca cymoxanil ve propamocarb içinde dayanıklılık söz konusudur (Hübschova and Lebeda, 2010; Pavelkova et al., 2014). Tek yer engelleyici diğer fungusit grupları olan Quinone dış engelleyicilere (Qol) ve karboksilik asit amidlere (CAA) karşı da dayanıklılık ve duyarlılık azalışı olduğu bir çok ülkede bildirilmiştir (Ishii et al., 2001; Blum et al., 2011; Sierotzki et al., 2011).

Hıyar mildiyösünün kontrolünde fungusit uygulamaları başarılı sonuçlar sağlıyor olsa da insan ve çevre sağlığı üzerindeki riskleri nedeniyle alternatif yöntemlere başvurulması kaçınılmazdır. Özellikle meyveleri taze olarak doğrudan tüketildiğinden fungusit kalıntılarına olan tolerans sıfırdır. Hastalığa karşı dayanıklılığı kontrol eden bütün genetik parametreler bilinmemektedir. Konukçu dayanıklılığının orijinal kaynağı (resesif *dm1* geni) ilk olarak 1954 yılında Hindistan'da, PI 197081 numaralı hıyar hatlarında bildirilmiştir (Barnes and Epps, 1954). *dm1* tarafından yönetilen savunma cevapları, klasik aşırı duyarlılık yanıtının göstergesi olan küçük nekrotik lezyonlar, enfeksiyon noktalarının kahverengileşmesi ve hızlı hücre ölümü ile karakterize edilir. 1950'li yıllardan sonra bu gen ticari birçok çeşide klasik ıslah metotları ile aktarılmış ve 2000'li yılların başına kadar da etkinliğini sürdürmüştür. Patojen popülasyonlarının genetik modifikasyona uğramaları nedeniyle günümüzde bu geni taşıyan çeşitler artık eskisi kadar dayanıklı reaksiyonlar göstermemektedir (Holmes and Thomas, 2006). Günümüzde hıyar mildiyösü için yapılan klasik ıslah çalışmaları dayanıklı

ve yüksek verimli hatların geniş bir skalada taranmasına ve uygun tekniklerle ıslahına dayanmaktadır.

Patojenin biyolojik yöntemlerle kontrolü hakkındaki çalışmalar oldukça azdır. Korbel (1990), hıyar yapraklarına *Phythium oligandrum* mikoparasitik fungusu uygulanmasının primer mildiyö enfeksiyonunu azalttığını ve yaprakların daha uzun süre yeşil kaldığını bildirmiştir. *Inula viscosa*'dan elde edilen ekstraktların *P. cubensis* zoosporlarının salımını inhibe ettiği (Wang et al., 2004), benzer şekilde *Allium sativum*'dan elde edilen allisin maddesinin enfeksiyon çıkışını en az %50 azalttığı bildirilmiştir (Portz et al., 2008). BABA'nın da *P. cubensis* üzerine direkt toksik etki göstermeksizin konukçu savunma mekanizmasını uyardığı gösterilmiştir (Baider and Cohen, 2003).

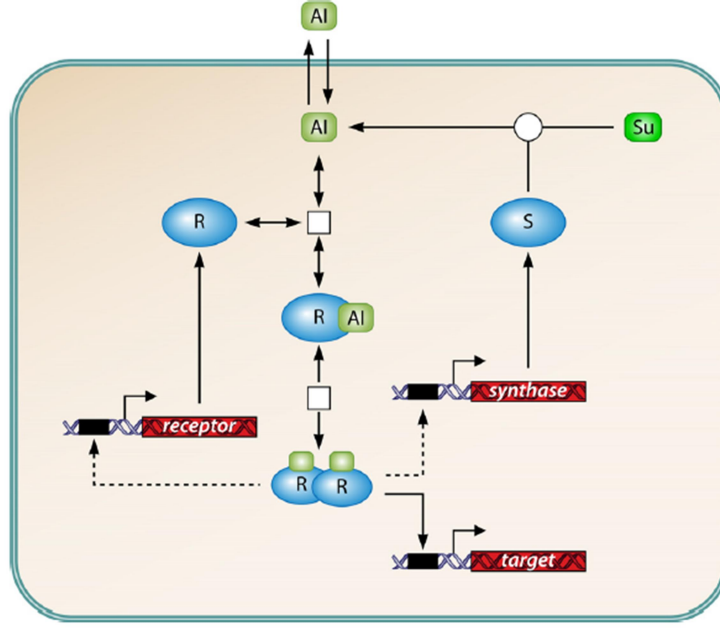
2.3 Quorum Algılama (Quorum sensing, QS)

Bakteriyel quorum algılama (QS), popülasyon yoğunluğundaki değişikliklere cevap olarak gen ekspresyonunu düzenlemek için oto-uyarıcı (AI) sinyallerin üretimine, salgılanmasına ve algılanmasına dayanan bir hücreler arası iletişim sürecidir. QS, kolonilerinde bulunan bir bakteri hücresinin biyoluminesans üretimi, biyofilm oluşumu, genetik değişim ve virülans faktörü ekspresyonu gibi grup davranışlarını gerçekleştirmek için önemli olan gen ekspresyonunun birlikte düzenlemesini sağlar (Ng and Bassler, 2009). Bakterilerin değişen ortam koşullarında düzenleme, hayatta kalma ve adaptasyon için gerekli olan önemli hücresel süreçleri düzenlemesi QS'ye bağlıdır (Bassler and Vogel, 2013). Biyokimyasal açıdan, bu sistem temel olarak bir sitoplazmik sinyal sentazını (veya bununla ilgili birkaç enzimi), çevreye salınan küçük, yayılabilir bir sinyali ve hücre zarında veya sitoplazmada bulunan bir sinyal reseptörünü içerir. Sinyal-reseptör kompleksi doğrudan veya dolaylı olarak hedef genlerin ekspresyonunu kontrol eder (Şekil 2.2). AI, hücre zarından pasif olarak salınabilir veya hücre tarafından salgılanabilir ve hücreler arasında iletişim kurmak için hücre dışı olarak düzenlenebilir veya veziküller içinde bulunabilir (Mashburn and Whiteley, 2005).

Bakteri popülasyonu arttıkça QS moleküllerinin sentezi ve buna bağlı olarak bulundukları çevredeki konsantrasyonları da artmaktadır. Konsantrasyon eşik değere ulaştığında, bir sinyal iletim kaskadı aktivasyonu, genellikle QS sinyal molekülü sentezi için gerekli QS hedef genlerinin uyarılmasına veya

baskılanmasına yol açar, böylece sinyal molekülü üretimini arttırmak için bir otomatik düzenleme mekanizması sağlanmış olur.

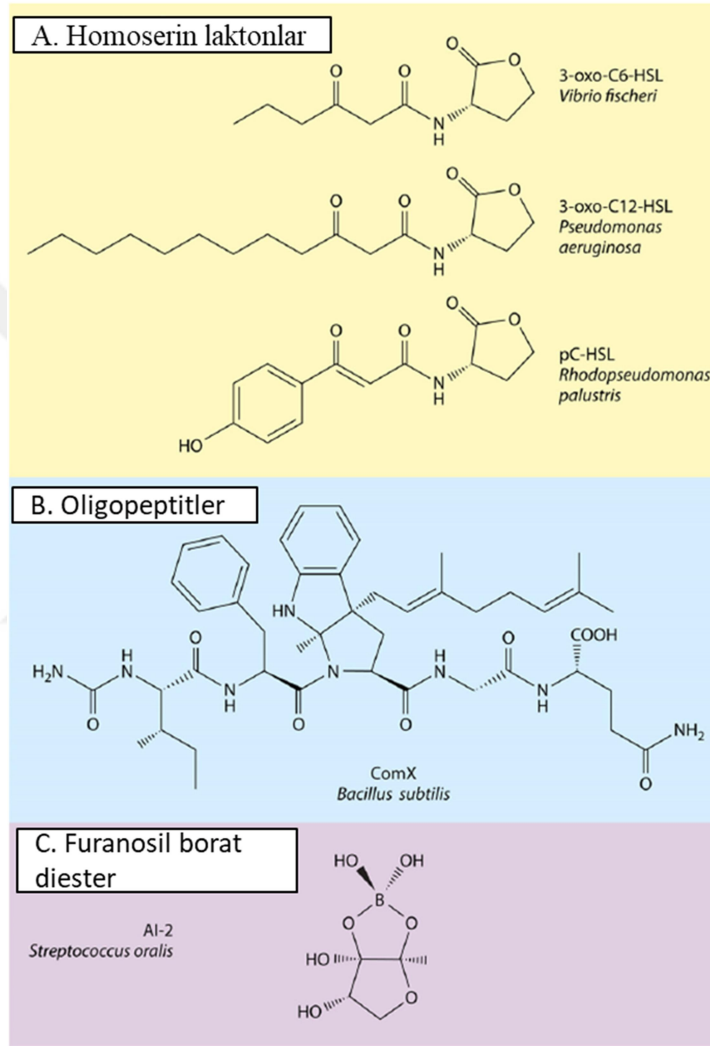
Heterojen popülasyonlarda yaşayan bakterilerin, kendileri, klonal kardeşleri, yakın akrabaları ve rekabet içinde olduğu diğer türlerin ürettiği kompleks oto-uyarıcı karışımları ile karşılaştıkları tahmin edilmektedir (Xavier and Bassler 2005; Ke et al., 2015). Bu nedenle bakteriler, ilişkili veya ilişkisiz moleküllerin karışımlarından bilgi çıkarmanın zorluğuyla karşı karşıyadır. Bu sorun, bakterilerin çoğu zaman birden fazla oto-uyarıcı üretebilmesi ve algılayabilmesi nedeniyle daha da artmaktadır. Bakterilerin kendilerinin ve çevresindeki diğer türler tarafından üretilen diğer moleküllerin karışımlarını doğru olarak nasıl yorumladıkları ve bu karışımlara cevap olarak gen ifadesinde uygun ve koordineli değişiklikleri nasıl ortaya çıkardıkları önemli sorulardır.



Şekil 2.2 AHL sinyalleşmesine dayalı bir hücrede oto-uyarıcı sinyal sistemi (Hense and Schuster, 2015) AI, oto-uyarıcı; R, reseptör; S, AI sentaz; Su, substrat. Metabolitler yeşil, proteinler mavi ve genler kırmızı ile gösterilmiştir. Siyah alanlar promotor bölgeleri, içi boş kutular kovalent olmayan interaksiyonları ve içi boş daireler enzimatik dönüşümleri simgelemektedir. Kesikli ok, bazı türlerde pozitif (genellikle sentaz ekspresyonuna göre) veya negatif olabilen opsiyonel geri bildirimi göstermektedir.

QS sinyallerinin çoğu küçük organik moleküller (<1000 Da) ya da 5-20 amino asitten oluşan peptitlerdir (Williams, 2007). Şu ana kadar 3 temel oto uyarıcı molekül belirlenmiştir: (i) temel olarak gram negatif proteobakterilerde

aynı zamanda da bazı bakteriodeteslerde, siyanobakterilerde ve arkealarda bulunan Açıl homoserin laktonlar (AHL), (ii) gram pozitif bakterilerde bulunan oligopeptidler ve (iii) türler arası iletişim için evrensel sinyaller olarak furanosil borat diesterler (Sharif et al., 2008; Zhang et al., 2012). Bu moleküllere ait genel kimyasal yapılar Şekil 2.3'te gösterilmiştir. Her geçen gün farklı kimyasal gruplara ait oto uyarıcı moleküller keşfedilmektedir (Kumar et al., 2013).



Şekil 2.3 Temel oto uyarıcı moleküller (Hense and Schuster, 2015) A) Homoserin Laktonlar, B) Oligopeptitler, C) Furanosil borate diester. Sınıflar, yapılar, bunlara karşılık gelen isimler ve bakteri türleri gösterilmektedir.

2.4 N-Açıl-L-Homoserin Laktonlar (AHLs)

Birçok Gram negatif bakterinin quorum algılama molekülü olarak ürettiği açıl homoserin laktonlar, çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesini koordine

etmede kritik bir rol oynarlar. AHL aracılı QS, virülens faktörlerinin üretimi, simbiyoz ve biyofilm oluşumu gibi, bireysel olarak bakterilerin yapamadığı bazı fizyolojik fonksiyonlar ve düzenleme mekanizmalarını gerçekleştirmiştir (Papenfort and Bassler, 2016). AHL molekülleriyle yürütülen QS için bir AHL-sentaz ve bir LuxR tipi düzenleyici gereklidir ve bunların aktivitesi AHL'ler tarafından düzenlenir (Bassler et al., 1994). AHL'lerin temel yapıları benzerdir ve bir homoserin lakton (HSL) halkası ile uzunluğu ve saturasyon seviyesi değişkenlik gösteren bir açıl zincirinden oluşur. Açıl zincirinin uzunluğu (C4 ile C18 arasında) molekülün özelliğini hidrofilitikten kuvvetli hidrofobiğe kadar değiştirebilir 3. karbon bir hidrojen-, oxo- ya da hidroksil substitisyonu içerebilir (Churchill and Herman, 2008). Bu varyasyon spesifiklik için önemlidir. Böylece bakteriler kendi ürettiği AHL'leri diğer türlerin ürettiği AHL'lerden ayırabilir (Frederix and Downie, 2011).

AHL üretiminden sorumlu 3 protein ailesinin olduğu bilinmektedir. LuxI tipi sentazlar α -, β - ve γ - proteobakterilerde bulunur ve bir açillenmiş açıl taşıyan protein ile S-adenozil metiyonin ligasyonunu katalize eder (Gray and Garey, 2001; Parsek et al., 1999). İkinci protein ailesi, sadece *Vibrio* ve yakın türlerinde bulunur ve *Vibrio harveyi*'den LuxM, *V. fischeri*'den AinS, *V. anguillarum*'dan VanM'yi içerir (Gilson et al., 1995; Milton et al., 2001). Bu proteinler LuxI tipi sentazlardan çok farklı olmalarına rağmen aynı reaksiyon mekanizmalarını kullanırlar. Üçüncü protein ailesi ise *Pseudomonas fluorescens*'den HdtS ve *Acidithiobacillus ferrooxidans*'tan Act proteinlerini içerir (Laue et al., 2000; Rivas et al., 2007). Bunların lizofosfatidik asit açıltransferaz protein ailesi ile ilişkili olduğu bilinmekle birlikte AHL'lerin oluşumunda nasıl rol oynadığı tam olarak bilinmemektedir.

AHL'ler hücre membranlarından difüze olabilir (Kaplan and Greenberg, 1985). Ayrıca uzun karbon zincirli AHL'lerin taşıyıcıları olduğu da bildirilmiştir (Chan et al., 2007). AHL konsantrasyonları parçalanma oranlarından etkilenmektedir. Yüksek sıcaklık ve alkali pH koşullarında enzimatik olmayan parçalanma yükselmektedir (Yates et al., 2002). Ayrıca AHL laktonazlar (Dong et al., 2001) ve AHL açılazlar (Sio et al., 2006) olmak üzere iki farklı enzimin AHL moleküllerini parçaladığı bilinmektedir.

Son yıllarda yürütülen birçok çalışma bitkilerin quorum sensing molekülleri olan açıl homoserin laktonları algıladığı ve onlara cevap oluşturduğunu göstermektedir. Eğer bitkiler AHL molekülleri ile temas ederse, onlara gen

ekspresyonlarında ve protein profillerinde değişiklik ve gelişimin modifiye edilmesi şeklinde cevaplar oluşturmaktadır (Bauer and Mathesius, 2004). Bugüne kadar yürütülen çalışmaların ve bu tez çalışmasının sonuçları, C4 ya da C6 gibi kısa açıl zincirli AHL moleküllerinin bitki gelişimini ve primer kök uzamasını arttırdığını (Palmer et al., 2014; Schenk et al., 2012; Bai et al., 2012; Liu et al., 2012; von Rad et al., 2008) bunun aksine C12 ya da C14 gibi uzun açıl zincirli AHL moleküllerinin ise bitki savunma sistemini uyardığını göstermektedir (Schenk and Schikora, 2015b; Schenk et al., 2014; Zarkani et al., 2013; Schikora et al., 2011).

2.4.1 AHL moleküllerinin bitki gelişimi ve performansı üzerine etkileri

Bakteriyel AHL moleküllerinin bitki fizyolojisi üzerine etkisi ilk olarak Mathesius et al. (2003) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar, proteom analizleri aracılığı ile ökaryotik bir konukçu olan *Medicago truncatula* türünün, hem simbiyotik (*Sinorhizobium meliloti*) hem de patojenik (*Pseudomonas aeruginosa*) bakterilerin ürettiği AHL moleküllerinin çok düşük konsantrasyonlarını dahi algıladığını ve 150'nin üzerinde proteinin birikiminde değişim meydana getirerek geniş çaplı bir yanıt verdiğini göstermişlerdir. Spesifik proteinlerin ve izoformlarının birikiminin AHL yapısı, konsantrasyonu ve bitki ile temas süresine bağlı olduğu ortaya konmuştur. Aynı zamanda bu çalışmada AHL uygulamasından sonra oksin bağımlı GH3 promotorunun da aktive olduğu ilk kez bildirmişlerdir. Takip eden yıllarda AHL algılanmasıyla bitki gelişiminin modifikasyonu ve değişen oksin seviyesi arasındaki ilişkiler üzerine detaylı çalışmalar yürütülmüştür. *Arabidopsis thaliana* köklerine N-hexanoyl-L-homoserin lakton (C6-HSL) uygulanmasının kök ve sürgünlerde farklı transkripsiyonel değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir (von Rad et al., 2008). C6-HSL uygulaması, hücre büyümesiyle ilişkili birkaç genin ve büyüme hormonları tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonlarında önemli değişimlere neden olurken, savunma ilişkili genlerin ifade profillerinde değişime neden olmamıştır. Oksin ve sitokinin orandaki değişiklik, C4- ve C6-AHL'lerin uygulanmasından sonra gözlenen kök büyümesini artırıcı etkiyi açıklayabilir. Bunun aksine Ortíz-Castro et al. (2008), AHL ile teşvik edilen bitki gelişiminde oksinin rol oynamadığını belirtmektedir. C10-HSL'nin, lateral kök oluşumu ve kök tüyleri gelişimi üzerindeki etkisinin, oksin tarafından düzenlenen DR5 promotorunun kontrolündeki GUS-raportör genlerinin ekspresyon analiziyle oksin sinyaleşmesinden bağımsız olduğu gösterilmiştir.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO) ve siklik GMP (cGMP) bitkilerin çeşitli fizyolojik proseslerinde önemli rolleri olan temel sinyal molekülleridir. Bai et al. (2012), maş fasulyesinde (*Vigna radiata*) N-3-oxo-decanoly-homoserine lactone (3-O-C10-HL)'nin yanal kök oluşumunu etkili bir şekilde teşvik ettiğini ve oksin ilişkili genleri aktive ettiğini bildirmiştir. Aynı cevaplar dışarıdan uygulanan H_2O_2 , NO ve cGMP homologlarına karşı da oluşturulmuş ancak bu moleküller ilişkili metabolizmaların temizleyicileri ya da inhibitörleri ile uygulandığında cevaplar baskılanmıştır. 3-O-C10-HL uygulaması oksin bazipetal transportu arttırmış ve bu etki, AHL uygulamalarının H_2O_2 ve NO temizleyicileri ile birlikte yapıldığında geri çevrilmiş ancak cGMP sentezi inhibitörü ile birlikte yapıldığında geri çevrilememiştir. 3-O-C10-HL ile uyarılmış H_2O_2 ya da NO birikimi inhibe edildiğinde oksin ya da 3-O-C10-HL uyarılmış cGMP sentezi bozulmuştur, ancak cGMP sentezi oksin ya da 3-O-C10-HL ile uyarılmış H_2O_2 ya da NO oluşumunu etkilemiştir. Bu sonuçlar 3-O-C10-HL'nin, muhtemel H_2O_2 ve NO bağımlı cGMP sinyalleri aracılığı ile maş fasulyesi fidelerinde oksin ilişkili yanal kök oluşumunu hızlandırabileceğini göstermektedir.

Arabidopsis thaliana'da 5 μ M oxo-C14-HSL ve C6-HSL moleküllerinin bitki gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. C6-HSL'nin primer kök uzunluğunu artırarak gövde ve kök yaş ağırlığında artışa neden olmuştur. Bunun aksine oxo-C14-HSL'nin bitki gelişimi üzerine bir etkisi gözlenmemiştir (Schikora et al. 2011).

Model bitkiler olan *Arabidopsis thaliana* ve *Medicago truncatula* türlerinde AHL'lerin alınımı ve oluşturduğu cevaplar üzerine kapsamlı bir çalışma yürütülmüştür (Palmer et al., 2014). Bu çalışmanın sonuçlarına göre AHL'ler açıl zincirinin uzunluğuna bağlı olarak bitki gelişimini önemli bir şekilde değiştirmektedir. *A. thaliana*'da yapılan mutant çalışmaları ve in vitro biyokimyasal analizlere dayanarak, gözlenen büyüme etkilerinin, bitki kaynaklı bir yağ asidi olan amid hidrolaz (FAAH) tarafından AHL amidolizine bağlı olduğu gözlenmiştir. AHL amidolizi sonucu oluşan L-homoserin birikiminin, transpirasyonu uyararak düşük konsantrasyonlarda bitki büyümesini teşvik ettiği görülürken, daha yüksek konsantrasyonlar etilen üretimini uyararak büyümeyi inhibe etmiştir.

Heterotrimerik G-protein ile düzenlenen hücre sinyalleşmesi ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş bir sinyalleşme mekanizmasıdır (Hamm et al., 1998).

Bitkilerde heterotrimerik G-protein sinyalleşmesi, hücre dışı çevresel sinyalleri hücre içine iletilmesini sağlar ve böylece bitki büyümesi ve gelişmesinde birçok rol oynar. Genetik çalışmalar, patojenlerin (Zhang et al., 2012), ozonun (Booker et al., 2012) ve ışığın (Schuster and Schmoll, 2009) heterotrimerik G proteinleri ilişkili sinyalleşmeyi aktive ettiğini göstermektedir. Ayrıca G-protein mutantlarının kullanıldığı çalışmalarda bitkilerin giberallik (Ullah et al., 2002), absisik asit (Eckardt, 2004), oksin (Ullah et al., 2003), brassinolidler (Chen et al., 2004) ve jasmonik asit (Okamoto et al., 2001) gibi fitohormonlara karşı verilen reaksiyonlarda G proteinlerinin rolleri ortaya konmuştur. *Arabidopsis* genomu, bir kanonik G-protein-bağlı reseptör (GPCR) kodlayan GCR1 ve heterotrimerik G proteinlerinin alt birimleri olan *GPA1* ($G\alpha$), *AGB1* ($G\beta$), *AGG1* ve *AGG2* ($G\gamma$) genlerini içermektedir (Mason and Botella, 2000). Liu et al. (2012), bakteriyel QS molekülleri ilişkili kök gelişiminin düzenlenmesinde *GPA1* ve *GCR1*'in rollerini araştırmıştır. Bu çalışmada 8 farklı AHL tipinin *Arabidopsis* kök gelişimi üzerindeki etkisi çalışılmıştır. 3-O-C6-HSL ve 3-O-C8-HSL molekülleri başta olmak üzere 8 karbon atomlu açıl zinciri uzunluğuna kadar olan tüm moleküller uygun konsantrasyonlarda kök gelişimini teşvik ederken C12-HSL ve C14-HSL gibi uzun açıl zincirli moleküller kök gelişimini inhibe etmiştir. Heterotrimerik G protein için spesifik inhibitör olan pertussis toksini 3-O-C6-HSL ve 3-O-C8-HSL'nin kök uzaması etkisini ortadan kaldırmıştır. Bu sonuç heterotrimerik G proteinin AHL'ye oluşturulan cevaplarda rol olabileceğini göstermektedir. *GCR1* fonksiyonu engellenmiş mutantların kullandığı çalışmalarda da 3-O-C6-HSL ve 3-O-C8-HSL gibi kısa zincirli AHL'lerin teşvik ettiği kök gelişimi doğal suşlardakine oranla gerilemiştir. Tek kanonik $G\alpha$ alt birimi *GPA1*'in boş mutantları, AHL'nin kök uzunluğu uyarımı etkisini göstermezken, hem w $G\alpha$ hem de c $G\alpha$ aşırı eksprese eden bitkiler, kök büyümesinin indüklenmesi için hem 3-O-C6-HSL hem de 3-O-C8-HSL'ye karşı artan hassasiyet göstermiştir. Tüm bu veriler *Arabidopsis* kök hücrelerinde AHL sinyalleşmesi süresince GCR1 ve GPA'nın rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir.

Kalsiyum bitkilerde yaygın olarak bulunan ikincil bir habercidir. Bitkilerdeki hücre içi sitosolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonları genellikle çevresel streslere cevap olarak yeniden düzenlenirler (van der Luit et al., 1999). Ca^{2+} sinyalleri çok çeşitli Ca^{2+} bağlayan proteinler ve onların alt hedefleri tarafından algılanmakta ve uygun hücresel cevaplara dönüştürülmektedir. Kalmodulin (CaM), EF-el adı verilen ortak kalsiyum bağlayıcı motive sahip asidik Ca^{2+} bağlayan proteinlerdir. En korunmuş proteinlerden biri olarak, kalmodulinin (CaM) hem hayvanlarda hem de bitkilerde temel hücresel işlemlerde yer aldığı

bilinmektedir. CaM, Ca^{2+} bağlanmasından sonra kendi katalitik aktivitesini ya da diğer hedef proteinlerle etkileşimini uyaran 3 boyutlu yapı değişikliğine gider (Cheval et al., 2013). CaM sinyalleşmesi çok çeşitli gelişimsel aşamalarda ve çevresel tepkilerde görev almaktadır. Işık, sıcaklık, kuraklık, tuz, patojenler ve fitohormonlar gibi birçok içsel ve dışsal etken ve etmenler CaM ilişkili sinyal iletimini etkilemektedir. Song et al. (2011), 10 μM C4-HSL'nin *Arabidopsis* kök hücrelerinin içindeki serbest Ca^{2+} seviyesinde önemli bir geçici artışa neden olduğunu göstermiştir. Ancak bu çalışmada, AHL moleküllerinin Ca^{2+} sinyali aracı proteini olarak CaM üzerine etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmanın devamı niteliğinde olan başka bir araştırmada, CaM antagonisti olan TFP (Trifluoperazine) ya da W-7 (N-(6-aminoheksil)-5-kloro-1-naftalen-sulfonamidi)'nin 3-O-C6-HSL uygulanmış *Arabidopsis* köklerinde AHL'nin neden olduğu primer kök uzaması etkisini ortadan kaldırdığı, W-7'nin inaktif yapısal analogu olan W-5 (N-(6-aminoheksil)-5-kloro-1-naftalen-sulfonamidi hidrokloridi)'in ise bu etkiyi değiştirmedeği bildirilmiştir (Zhao et al., 2015). Ayrıca CaM proteinin antikorları kullanılarak yapılan western blot ve ELISA analizleri ile 3-O-C6-HSL uygulamasının CaM proteinini arttırdığı ve uygulamadan sonra altıncı saatte seviyenin maksimuma ulaştığı bulunmuştur. Bu moleküllerin tek başlarına uygulandığı kontrol bitkilerinde herhangi bir kök uzaması tespit edilmemiştir. Bu veriler de TFP ve W-7 varlığında ortadan kalkan 3-O-C6-HSL ilişkili kök uzaması etkisinin CaM aktivitesinin engellenmesinden kaynaklandığını kanıtlamaktadır.

Yapılan çalışmalardan G proteini ilişkili reseptörlerin ve heterotrimerik G proteinlerin AHL ilişkili kök uzamasında görev aldığı ve GPCR'lerin bitkilerde AHL reseptörü için kuvvetli bir aday olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, AHL molekülleri ile indüklenebilen Ca^{2+} konsantrasyonundaki geçici bir yükselme, hücre dışı boşluktan hücrelere Ca^{2+} akışını teşvik ederek sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonunun artmasına katkıda bulunmaktadır. 3-O-C6-HSL gibi kısa zincirli AHL'ler GPCR tarafından tanınabilir ve $\text{G}\alpha$, bu tanıma sonrası aktive edilmektedir. $\text{G}\alpha$ aktivasyonu sonrası plazma membranındaki Ca^{2+} kanallarının açılması sonucu sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunda artış meydana gelmektedir. Artan sitoplazmik Ca^{2+} direkt olarak CaM'yi aktive eder. Aktive olan CaM, spesifik hücresel reaksiyonları düzenleyen ilgili kaskadları tetikler ve fenotipik yanıtlar oluşturulur (Song et al., 2011)

Götz-Rösch et al. (2015), C6-HSL, C8-HSL ve C10-HSL moleküllerinin iki kültür bitkisi olan arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve Meksika turbu (*Pachyrhizus*

erosus L.) üzerine etkilerini araştırmıştır. Her iki bitki türü de kullanılan AHL moleküllerine karşı bitki gelişimi ve pigment içeriği bakımından çok küçük tepkiler verse de detoksifikasyon enzimleri açısından dokuya ve AHL'ye bağlı olarak önemli cevaplar oluşturmuştur. Arpa köklerinde C10-HSL uygulaması sonucu dehidroaskorbat redüktaz aktivitesinde kontrole göre %384 artış gözlenirken C6-HSL uygulaması sonucu süperoksit dismutaz aktivitesinde %23 azalış saptanmıştır. Diğer antioksidan enzimlerin aktiviteleri de AHL uygulamasına bağlı olarak benzer değişimler göstermiştir. Genel olarak enzim seviyelerinde meydana gelen değişimler arpa bitkilerinde turba oranla daha fazla gözlenmiştir.

Hordeum vulgare'nin kullanıldığı diğer bir çalışmada C8-HSL ve C12-HSL moleküllerinin 10 μ M dozları yaprak ve kök kuru ağırlıklarında artışa neden olmuştur (Rankl et al., 2016). Hem kısa zincirli hem de uzun zincirli AHL'ler yanal kök oluşumunda önemli artışa neden olmuştur. Total kök uzunluğu, total kök yüzey alanı ve ortalama kök çapı bakımından AHL'lerin herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Bitki biyomasında AHL aracılığıyla meydana gelen artışın nedeni artan dallanmış kök sisteminin daha iyi ve fazla mineral madde alabilmesi şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca, C6-HSL, C8-HSL ve C12-HSL hem kaliptrada hem de uzama bölgesinde nitrik oksit birikimine neden olmuştur. Uzun zincirli molekülün neden olduğu birikim kısa zincirli oranla daha düşüktür. NO tutucusu olan cPTIO varlığında AHL kaynaklı NO birikimi baskılanmıştır. Bu durum AHL moleküllerinin köklerde NO birikimini aktive ettiğini göstermektedir. Önceki çalışmalar AHL'lerin membranlarla doğrudan etkileşimlerini (Davis et al., 2010) ve daha sonra desteklenen çift katmanlara entegrasyonunu (Barth et al., 2012; Jakubczyk et al., 2012) göstermiştir. C8 ve C10-HSL ve bunlara karşılık gelen metabolitler kök dokularında bulunmuştur ve bu durum quorum algılama moleküllerinin difüzyon yoluyla veya ABC taşıyıcıları vasıtasıyla aktif bir şekilde hareket ettirebileceğini göstermektedir (Sieper et al., 2014; Götz-Rösch et al., 2015; Jakubczyk et al., 2012). Hidrofilikliklerine uygun olarak, kısa zincirli AHL'ler köklere uzun zincirli AHL'lerden daha az bağlanırlar, bu da membranlar arasında daha hızlı geçiş ve simplastlarda taşınmaya neden olur. Bu özellikleri, arpa köklerinde kısa zincirli AHL'lerin daha fazla NO üretimini açıklayabilir. Ayrıca, daha uzun lipofiliklik ve dolayısıyla düşük simplastik taşıma oranlarına sahip C12-HSL, aynı inkübasyon süresinde NO üretiminde daha küçük artışlara neden olmuştur. Sieper et. al. (2014) uzun zincirli C10-HSL'nin kısa zincirli C8-HSL'ye göre daha yavaş taşındığını arpa bitkilerinde göstermiştir.

AHL'lerin bitki büyümesi ve gelişimi üzerine etkileri saf moleküllerin yanında AHL üreten bakterilerin kullanıldığı çalışmalar ile de ortaya konmuştur. Zarkani et al. (2013), uzun zincirli bir AHL molekülü olan oxo-C14-HSL üreten *Sinorhizobium meliloti* expR⁺ ırkının *Arabidopsis*'te bitki kök uzunluğunda ve gövde ağırlığında bir değişim meydana getirmediğini ortaya koymuştur. Ancak laktonaz üreten *R. elti* [(*R. elti* attM⁺(Km^R) ve *R. elti* attM⁺(Gm^R)] ırkları doğal suşa ve kontrole göre daha düşük kök uzunluğuna ve gövde ağırlığına neden olmuştur.

AHL moleküllerinin bitki kök gelişimi üzerindeki farklı etkilerinin uygulama yöntemleri, AHL konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve çalışma koşullarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak çalışmaların çoğundan elde edilen ortak kanı kısa zincirli AHL moleküllerinin kök uzamasını teşvik etmesi, orta zincirli olanların kök fenotipinde değişimlere neden olması ve uzun zincirli AHL moleküllerinin ise kök yapısında değişim meydana getirerek büyümeyi inhibe etmesidir.

Bu sonuçlar, konukçu bitkilerin QS sinyallerine cevap verebilecekleri mekanizmalar ve QS'nin alemler arası ilişkilerinde potansiyel rolü hakkında önemli bilgiler sunmaktadır.

2.4.2 AHL moleküllerinin bitki savunma sistemleri üzerine etkileri

AHL'ler molekül tipleri, konsantrasyonları ve bitki ile etkileşim sürelerine bağlı olarak bitki savunma sistemlerini harekete geçirmektedir. Bugüne kadar AHL moleküllerinin farklı bitki türlerinde patojenlere karşı dayanıklılığı uyardığı bildirilmiştir. Schuegger et al. (2006), domates köklerinde kolonizasyonu sırasında N-butanoyl (C4) ve N-hexanoyl (C6) homoserin lakton üreten *Serratia liquefaciens* MG1 ırkının, fungal yaprak patojeni olan *Alternaria alternata*'ya karşı sistemik dayanıklılığı arttırdığını göstermiştir. Bu çalışmada, AHL üretimi baskılanmış *Serratia liquefaciens* MG44 mutanti hastalığın engellenmesinde AHL üreten gruplara göre daha az başarılı bulunmuştur. Makroarray ve Northern blot analizleri, AHL ile uyarılan sistemik dayanıklılığın salisilik asit ve etilen ilişkili savunma genleri (*PR1a*, 26 kDa asidik ve 30 kDa bazik kitinaz) aracılığı ile olduğunu ortaya konmuştur. Benzer şekilde *Serratia plymuthica* HRO-C48 ırkı tarafından üretilen AHL, hıyarda çökerten etmeni olan *Pythium aphanidermatum*'a karşı bitki dayanıklılığını uyarmıştır (Pang et al., 2009).

Ayrıca domatest ve fasulyede *Botrytis cinerea*'ya karşı AHL ilişkili sistemik dayanıklılık meydana gelmiştir.

Zarkani et al. (2013), uzun zincirli bir AHL molekülü olan oxo-C14-HSL üreten *Sinorhizobium meliloti* expR⁺ ırkının *Arabidopsis thaliana*'da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı bitki dayanıklılığı nasıl etkilediğini araştırmıştır. Bu çalışmada azot fiksasyonu ve nodülasyon ilişkili etkileri elimine etmek amacıyla *S. meliloti*'nin doğal konukçusu olan *Medicago tuncatula* yerine *Arabidopsis thaliana* tercih edilmiştir. *S. meliloti* expR⁺ inokulasyonu yapılmış bitkilerde kontrole göre *Pst* enfeksiyonu belirgin bir şekilde düşük çıkmıştır. Daha düşük konsantrasyonlar ya da hiç oxo-C14-HSL üretmeyen ırkların (*S. meliloti* expR, *S. meliloti* attM⁺) kullanıldığı deneme gruplarında dayanıklılık etkisi daha az gözlenmiştir ya da hiç gözlenmemiştir. Bu durum da dayanıklılığı uyarıcı etkinin AHL bağımlı olduğunu kanıtlamaktadır. Patojenisite ilişkili (PR) genlerden olan *PR1* ve *Pdfl.2* genlerinin ekspresyon profilleri incelendiğinde, *S. meliloti* expR⁺ ırkından elde edilen ekstratın uygulandığı bitkilerin *PR1* ve *Pdfl.2* ekspresyon seviyelerinin AHL üretmeyen ya da daha az AHL üreten gruplara kıyasla önemli artış gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlar oxo-C14-HSL üreten *S. meliloti* ırklarının *Arabidopsis thaliana*'da erken kolonizasyonun priming etkisi yaptığını göstermektedir. Ancak uyarılmış sistemik dayanıklılık ilişkili *MYC2* ve *Myb72* transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon profili analizleri *S. meliloti* expR⁺ aracılı priming etkisinin, bilinen yaygın priming mekanizmaları ile gerçekleşmediğini ortaya koymuştur. Normal şartlarda AHL üreten suşun, *MYC2* ve *Myb72*'nin ekspresyon seviyelerini arttırmasını beklenirken AHL üretmeyen ya da daha az AHL üreten ırkın bu transkripsiyon faktörlerinin ifadelerini arttırdığı saptanmıştır. Bu sonuçlar oxo-C14-HSL üreten *S. meliloti* suşun flg22 uygulamasından sonra uyarılmış ISR ilişkili genlerin ekspresyonlarına müdahale ettiğini göstermektedir.

AHL üretimi arttırılmış bakterilerin bitkilerde kolonizasyonun yanında saf olarak üretilen AHL molekülleri de bitki savunma sistemini uyarmaktadır. Schikora et al. (2011) 5 haftalık *Arabidopsis* bitkilerine hidroponik çözelti içerisinde 6 µM dozunda oxo-C14-HSL uygulamıştır ve uygulamadan 3 gün sonra yapraklar *Pst* ile inokule edilmiştir. Oxo-C14-HSL uygulaması yapılan bitkilerde hastalık çıkışı kontrol bitkilerine oranla çok daha düşük bulunmuştur. Hastalık çıkışı azalışının molekülün bakteri üzerine direkt etkisinden kaynaklanabileceği ihtimali üzerine, 6 µM dozunda oxo-C14-HSL içeren kültürde *Pst*'nin proliferasyonu araştırılmıştır. *Pst*'nin AHL içeren ortamda kontrol ile aynı oranda

geliştiği saptanmıştır. Ayrıca yapılan patojenisite testleri de AHL ilişkili hastalık çıkışının molekülün bakteri üzerindeki direkt etkisinden değil, bitki savunma sistemi üzerinde meydana getirdiği etkiden kaynaklandığını göstermiştir. Belirtilen dozda kökten yapılan oxo-C14-HSL uygulamasının *Arabidopsis*'te obligat biotrofik fungus olan *Golovinomyces orontii*'ye ve buğdayda *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*'ye karşı da sistemik dayanıklılığı arttırdığı ancak nekrotrof patojenler olan *Botrytis cinerea* ve *Plectosphaerella cucumerina*'ya karşı dayanıklılığı uyarmadığı bildirilmiştir. Oxo-C14-HSL n uygulaması yapılmış bitkilerin flg22 ile muamelesi mitojenle aktive olan protein kinazlar AtMPK3 ve AtMPK6'da, savunma ilişkili transkripsiyon faktörleri olan *WRKY22* ve *WRKY29*'da ve *PR1* geninde güçlü aktivasyon gözlenmiştir. Doğal suş ve *mpk3* mutanrı olan *Arabidopsis*'lerin aksine *mpk6* mutantında AHL uyarılmış dayanıklılık gözlenmemiştir, bu durum AHL ilişkili dayanıklılıkta AtMPK6'nın gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

Birbirinden bağımsız çeşitli çalışmalar, bitkilerin farklı AHL moleküllerine spesifik tepkiler verdiğini göstermektedir. Schenk et al (2014), bitkiler üzerinde farklı etkileri olduğu bildirilen N-hexanoyl-L-homoserin lakton (C6-HSL), N-3-oxo-decanoyl-L-homoserin lakton (oxo-C10-HSL) ve N-3-oxo-tetradecanoyl-L-homoserin lakton (oxo-C14-HSL) molekülleri uygulanan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin transkriptom profilini incelemiştir. Bu kapsamda 2 haftalık bitkiler 6 M dozunda belirtilen türde saf AHL içeren yarım seyreltik MS ortamında 3 gün boyunca geliştirilmişlerdir. Mikroarray sonuçları 214 adet genin sadece C6-HSL'ye, 226 adet genin sadece oxo-C10-HSL'ye, 177 adet genin sadece oxo-C14-HSL'ye cevap verdiğini ve 55 genin ifadesinin her üç molekülde de benzer şekilde değiştiğini göstermiştir. Fonksiyonel anotasyon sonuçları ifadesi benzer şekilde değişen ortak genlerin birçoğunun biyotik stres ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Daha nceden Song et al. (2011) ve Liu et al. (2012)'nin *Arabidopsis*'te bildirdiğine paralel olarak bu genler içerisinde de G-proteinleri ve kalsiyum sinyalleşmesi ile ilişkili genler önemli yer tutmuştur. Transkriptom analizleri bitki hücre duvarlarının yapısal komponentlerinden olan ve hidroksiprolince zengin glikoprotein ailesinde yer alan arabinogalaktan ve prolince zengin diğer proteinleri kodlayan genlerin upregule olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak polisakkaritlerin modifikasyonunda görev alan genlerin ve hücre duvarını parçalayan enzimler olan pektinazların oluşumuyla ilişkili genlerin oxo-C14-HSL'ye cevap verdiği bulunmuştur. Hidroksiprolinlerce zengin glikoproteinlerin çapraz bağlanması ve glikozilasyon hücre duvarının güçlendirilmesinde önemli aşamalardır ve patojenlerin istilasını önlemede bitki

dayanıklılığına önemli katkı sağlarlar (Wei and Shirsat, 2006). Bu çalışma kapsamında oxo-C14-HSL ile uyarılmış bitkilerin flg22 ile karşılaşması sonucu kalloz birikiminde, fenolik bileşiklerin ve ligninin miktarında önemli artış meydana gelmiştir.

Sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) ve uyarılmış sistemik dayanıklılık bugüne kadar en iyi anlaşılan iki sistemik direnç mekanizmasıdır. Bunlardan jasmonik asit/etilen hormonları ISR mekanizmasında salisilik asit ise SAR mekanizmasında görev alır. Schenk et al (2014), AHL uyarılmış dayanıklılıkta bu yollardan hangisinin çalıştığını araştırmıştır. Oxo-14-HSL uygulaması sonucu jasmonik asit üretemeyen *Arabidopsis* mutantlarında (*Coil-16* ve *jar1-1*) dayanıklılık gözlenmiş ve JA ilişkili *MYC2* ve *VSP2* genlerinin ifadeleri etkilenmemiştir. Kantitatif hormon analizleri de JA ve onun bioaktif türevi olan JA-IIe'nin oxo-C14-HSL uygulamasından etkilenmediğini göstermektedir. Ayrıca ISR özelliği susturulmuş *myb72* mutantlarında oxo-C14-HSL uygulamasının *HSP70* ve *GST6* genlerinin ekspresyonlarını artırması ve doğal tip *Arabidopsis* bitkilerinde *MYB72* veya ET'ye cevap oluşturan genlerin eksprese olmaması bitki tarafından oluşturan AHL ilişkili dayanıklılığın JA yolağından ve uyarılmış sistemik dayanıklılık mekanizmasından bağımsız olduğunu göstermektedir.

Oksilipinlerin (JA öncüleri) bitki stres cevabında rol oynadığı bilinmektedir. Schenk et al. (2014), SA'nın yanında oksilipin cis-OPDA'nın da birikiminde artış tespit etmiştir. OPDA'nın *COI1*'den bağımsız (Mueller et al., 2008) ve *bZIP* transkripsiyon faktörleri olan *TGA2*, *TGA5* ve *TGA6* gerektiren bir dizi genleri uyardığı literatürde mevcuttur (Stotz et al., 2013). Benzer şekilde bu çalışmada da AHL ilişkili dayanıklılık için *LOX2* lipoksigenaz ve *TGA2/5/6* transkripsiyon faktörlerinin gerekli olduğu ve *COI1*'den bağımsız gerçekleştiği gözlenmiştir.

2.4.3 Çeşitli bitki-bakteri ve bakteri-bakteri etkileşimlerinde meydana gelen farklı quorum algılama (QS) manipülasyon mekanizmaları

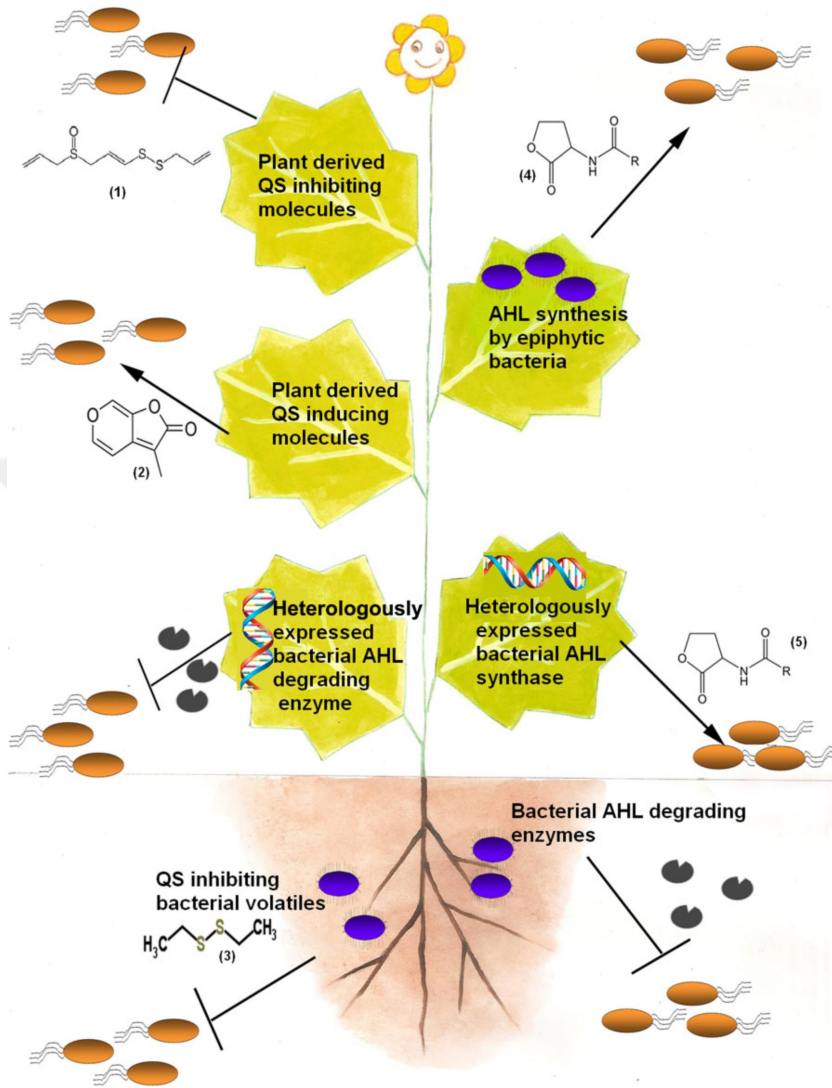
Birçok patojenik bakterinin bitkilerde hastalık oluşturmaları QS sürecine bağlıdır. Bu bağımlılık, virülense bağlı bazı özelliklerin yalnızca bakteri popülasyonu belirli bir yoğunluk eşiğine ulaştığında uyarılabilir olmasından kaynaklanmaktadır (Andersen et al., 2010). Gram pozitif fitopatojenik bakteriler tarafından üretilen QS sinyal moleküllerinin mekanizmaları hakkında detaylı bilgiler bulunmamaktadır (Hogenhout and Loria, 2008). Bunun aksine, Gram negatif fitopatojenik bakterilerin virülens özelliklerinde QS etkisi ile ilgili veriler,

son on yılda hem temel hem de pratik çalışmalarda daha fazla ortaya konmuştur. Geniş bir konukçu dizisine sahip olan yumuşak çürük pektobakterilerin, enfeksiyon için AHL ve QS'ye bağlı olduğu karakterize edilmiştir. Birkaç pektobakteride QS'nin, Nip (nekrozu indükleyen virülans proteini), Svf (salgılanmış virülans faktörü) (Corbett et al., 2005), antibiyotik karbapenem (Barnard et al., 2007) ve tip III salgılanan harpin HrpN (Mukherjee et al., 1997) dahil olmak üzere bitki hücresi duvarını parçalayan üretimini düzenlediği bildirilmiştir. Liu et al. (2008) tarafından yapılan mikroyarray çalışması QS'nin *Pectobacterium atrosepticum*'daki patojenisitenin ana düzenleyicisi olduğunu saptamıştır. Bu veri QS moleküllerinin patojenisite ile doğrudan ilişkili olduğunu ve pektobakteriler tarafından meydana getirilen enfeksiyonların mücadelesinde bu yolların hedeflenmesinin önemini ortaya koymuştur.

QS'nin patojenik bakterilerde virülansla ilgili özelliklerin indüklenmesinde oynadığı rolün bir sonucu olarak, birçok çalışma QS yollarını bozan antagonistik molekülleri ve enzimleri tanımlamayı amaçlamıştır. Hem hayvanlarda hem de bitkilerde hastalıkların mücadelesinde kullanılmak üzere doğal ve sentetik bileşikler araştırılmaktadır. QS'ye müdahale mekanizması “quorum söndürme” (Quorum quenching, QQ) olarak adlandırılır ve birkaç şekilde gerçekleştirilebilir: (i) QS sinyal moleküllerinin biyosentezinde görev alan enzimlerin aktivitesinin/transkripsiyonun inhibisyonu, (ii) QS sinyal moleküllerinin besiyerinde imha edilmesi ve böylece birikimlerinin önlenmesi, (iii) QS reseptörlerinin aktivasyonunun inhibisyonu (Chernin et al., 2011; Czajkowski and Jafra, 2009). Bu üç mekanizmadan, bitki patolojisi açısından en çok çalışılan ve uygulanan yöntem, yumuşak çürüklüğe neden olan pektobakterilere karşı AHL parçalayan enzimlerinin kullanılmasıdır.

Günümüzde bakterilerin ürettiği QQ enzimlerinin komşu bakterilerin QS yollarını inhibe ettiği genel olarak kabul edilmektedir. Bu enzimlerin, komşu bakterilerin QS yollarını inhibe etmek için mutlaka üretilmeleri gerekmez, ancak QS sinyal moleküllerini bozmaya ve bunları kullanılabilir gıda ve enerji kaynakları haline getirmeye hizmet edebilirler (Leadbetter and Greenberg, 2000). İlk QQ enzimi gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus* sp. 240B1 ırkında tespit edilmiş ve saflaştırılmıştır (Dong et al., 2000). Bu enzimi kodlayan genin *aiiA* (AI aktivasyonu için) olarak adlandırıldığı ve protein ürününün lakton halkanın hidrolizi ile AHL sinyallerini inaktive ettiği gösterilmiştir (Dong et al., 2001). *Pectobacterium carotovorum*'da (eski adıyla *Erwinia carotovora*) *aiiA*'nın ifadesi,

patates, patlıcan, lahana, havuç ve kerevizin farklı dokularında AHL salınımını ve yumuşak çürük hastalık semptomlarını önemli ölçüde azaltmıştır.



Şekil 2.4 Çeşitli bitki-mikroorganizma etkileşimlerinde meydana gelen farklı quorum algılama (QS) manipülasyon mekanizmaları (Helman and Chernin, 2015) (1) Bitkiler tarafından üretilen doğal bir QS inhibe edici madde Ajoen, (2) Bitkiler tarafından üretilen doğal bir QS-indükleyici madde Karakin, (3) QS'yi inhibe eden bakteriyel uçucular için dimetil disülfür, (4, 5) Sırasıyla epifitik bakteri veya transgenik bitkiler tarafından üretilen N-Açıl-L-homoserin laktonu (AHL). Sivri oklar, QS indükleme mekanizmalarını gösterir; T şeklindeki işaretler QS inhibe edici mekanizmalar göstermektedir. Gri omnomonomonlar AHL'yi parçalayan enzimlerini gösterir; kahverengi eliptik şekiller etkilenen bakterileri gösterir (örneğin, fitopatojenler); mor eliptik şekiller bitki ile ilişkili bakterileri gösterir (örneğin bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler, PGPR).

Bacillus spp., *Pseudomonas* spp., *Ochrobactrum* sp, *Ralstonia* sp. *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella pneumonia* (Han et al., 2010; Fekete et al., 2010; Haudecoeur et al., 2009; Park et al., 2003; Mei et al., 2010) gibi bakteri türlerinin de AHL parçalayan enzimlere sahip olduğu bulunmuştur.

QS sinyallerini üreten bakterilerin bitkilerle aynı habitatı paylaşmasının bir sonucu olarak, bitkilerin QS yollarının antagonistleri olarak işlev gören bileşikler üretmeleri şaşırtıcı değildir. Bugüne kadar üretimleri bitkinin gelişim aşamasına göre değişen düzinelerce bitki molekülü, bakteriyel sinyalleşmesini engelleme potansiyelleri açısından araştırılmıştır. Farklı bitki türleri, bakteriyel QS sistemini uyaran ya da bozan çeşitli AHL benzerleri salgırlar (Bauer and Mathesisus, 2004). McDougald et al. (2007) bitkilerde ve bakterilerde QS'nin biyolojik benzerlerini keşfetmiştir. Bitkilerde üretilen bu AHL benzerlerinin yapıları, biyolojik önemi ve net kaynakları hakkında bilgiler kısıtlıdır ve bunların fonksiyonları konusunda araştırmacılar arasında farklı görüşler bulunmaktadır. Bu bileşikler tıp, tarım, farmokoloji, kozmetik ve gıda biyoteknolojisinden tekstile kadar çeşitli endüstrilerde yoğun bir şekilde denenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi

3.1.1 Tohumların temini

Beith Alpha çeşidi hıyar (*Cucumis sativus* L.) tohumları Küçük Çiftlik Tohumculuk firmasından temin edilmiştir.

3.1.2 Tohum sterilizasyonu

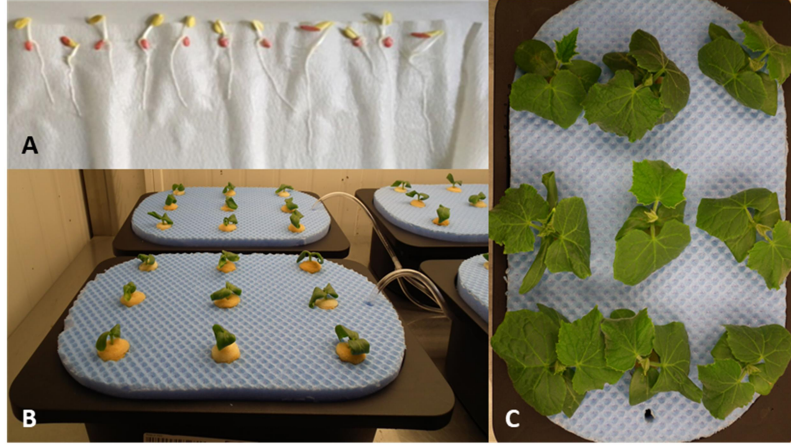
Temin edilen tohumlar 10 dk boyunca %5 sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi içinde tutulduktan sonra steril distile suda 3 kez yıkanarak sterilize edilmiştir (Wang et al., 2010).

3.1.3 Bitkilerin *in vitro* olarak yetiştirilmesi

Kök fenotipi analizleri için hıyar bitkileri *in vitro* olarak yetiştirilmiştir. Steril edilen tohumlar %0,7 agar ile katılaştırılmış MS (Murashige and Skoog, 1962) içeren 10x10 cm boyutlarında petrilere ekilmiştir. Bitkiler, 24 saat karanlıkta tutulduktan sonra iklim kontrollü odalarda ($23\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %65-75 oransal nem, 16/8 saat aydınlık/karanlık, $300\ \mu\text{mol foton m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti) dikey olarak 6 gün boyunca yetiştirilmişlerdir.

3.1.4 Bitkilerin hidroponik olarak yetiştirilmesi ve optimizasyonu

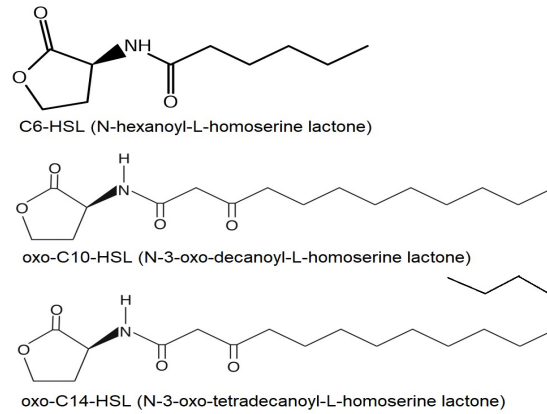
Tohumlar, steril edildikten sonra 25°C 'de 1 mM CaSO_4 içeren ortamda 5 gün boyunca çimlendirilmiş ve büyütülmüştür (Şekil 3.1A). Homojen olarak gelişen bitkiler $\frac{1}{4}$ seyreltilmiş besin çözeltisi içeren 3 litrelik kaplara transfer edilmiş ve iklim kontrollü odalarda ($23\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %65-75 oransal nem, 16/8 saat aydınlık/karanlık, $300\ \mu\text{mol foton m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti) hidroponik sistem kullanılarak büyütülmüştür (Şekil 3.1B, Şekil 3.1C). Bu araştırmanın başlangıcında farklı besin çözeltileri denenmiş ve bitki gelişimi açısından en uygun bulunan çözelti ile tüm denemeler yürütülmüştür. Bu çözelti, 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,7 mM K_2SO_4 , 0,1 mM KH_2PO_4 , 0,1 mM KCl, 0,5 mM MgSO_4 , 10 μM H_3BO_3 , 0,5 μM MnSO_4 , 0,2 μM CuSO_4 , 0,1 μM ZnSO_4 , 0,01 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 80 μM Fe^{III} -EDTA içermektedir. Besin çözeltisi sürekli olarak akvaryum pompası aracılığı ile havalandırılmış ve ortalama olarak her 3 günde bir yenilenmiştir.



Şekil 3.1 Hidroponik olarak yetiştirilen hıyar bitkileri A) CaSO_4 ortamında çimlendirilen hıyar tohumları, B) 7 günlük hıyar bitkileri, C) 21 günlük hıyar bitkileri.

3.2 Açıl Homoserin Lakton (AHL) Uygulamaları

Hidroponik ortamda ilk gerçek yaprağı tam büyüklüğe ulaşan bitkilere AHL uygulamaları yapılmıştır. Çalışmada kısa (C6-HSL, N-hexanoyl-L-homoserin lakton), orta (oxo-C10-HSL, N-3-oxo-decanoyl-L-homoserin lakton) ve uzun (oxo-C14-HSL, N-3-oxo-tetradecanoyl-L-homoserin lakton) karbon zincirine sahip AHL molekülleri kullanılmıştır (Şekil 3.2). Moleküller Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) firmasından temin edilmiştir. Asetonda çözülmüş AHL moleküllerinden 10 mM stok solüsyonu hazırlanmıştır. Hıyar bitkilerine 3 gün boyunca final konsantrasyonu 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM olacak şekilde AHL uygulaması (hidroponik ortam çözeltisini eklenerek) yapılmıştır. Tüm denemelerde hiç uygulama yapılmayan bitkiler ve sadece aseton uygulanan bitkiler kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2 AHL moleküllerinin kimyasal yapıları

3.3 AHL Uygulamalarının Kök Fenotipi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

İçerisine belirtilen tipte ve konsantrasyonlarda AHL ilave edilmiş MS ortamında 6 gün boyunca büyütülen bitkilerin kök fenotipinin fotoğrafları çekilmiş ve kök büyümesi ve gelişmesi ile ilgili bazı parametreler değerlendirilmiştir. Image J paket programı aracılığı ile primer kök uzunluğu (cm), lateral kök sayısı, kök ucundan 2 mm uzaklığa kadar olan mesafedeki kök tüyü yoğunluğu, kök ucundan 1 cm uzaklıktaki 1 mm alandaki kök tüyü yoğunluğu ve bu kök tüylerinin ortalama uzunluğu (μm) ölçülmüştür.

3.4 AHL Uygulamalarının Bitkilerin Gelişimi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

CaSO_4 içeren nemli kâğıtlarda 5 gün boyunca büyütülen bitkiler içerisinde $\frac{1}{4}$ seyreltik besin çözeltisi içeren ortama aktarılmış ve burada 15 gün büyütülmüştür. Ardından AHL molekülleri belirtilen tipte ve konsantrasyonlarda hidroponik çözelti içerisine ilave edilmiştir.

3.4.1 İyon sızıntısı (Membran zararlanma indeksi)

AHL uygulamasından 72 saat sonra membran zararlanma indeksi hesaplanmıştır. Bunun için yaprak ana damarlarını içermeyecek şekilde her bir yaprakтан 2 disk (1,5 cm) alınmış ve 5 ml steril ddH₂O içeren falkon tüplere konulmuştur. Tüpler 4 saat boyunca oda koşullarında karıştırıcı üzerinde tutulmuş ve iletkenliği ölçülmüştür (EC1). Ardından tüpler otoklavlanmış ve içerisindeki sıvı soğuduktan sonra ikinci iletkenlik ölçümü (EC2) yapılmıştır. $(\text{EC1}/\text{EC2}) \times 100$ formülü kullanılarak yüzde iyon sızıntısı değeri hesaplanmıştır (Lukatkin, 2003).

3.4.2 Toplam klorofil içeriği

Toplam klorofil içeriği AHL uygulamasından 72 saat sonra ölçülmüştür. Ana yaprak damarlarını içermeyecek şekilde 0,1 gr yaş yaprak dokusu 20 ml %80 aseton içerisinde homojenize edilmiş ve siyah bant filtre kâğıdından süzölmüştür. Süzük PG Instruments T60U (Shimadzu, Japan) marka spektrofotometre ile ölçülmüştür ve aşağıdaki formül aracılığı ile mg/g yaş ağırlık olarak hesaplanmıştır (Arnon, 1949; Yang et al., 2009).

$$Chl = [(20,2 * A645) + 8,02 * A663] * \frac{V}{W * 1000}$$

Chl: Toplam klorofil, V: Solvent hacmi (ml), W: Alınan örneğin yaş ağırlığı (g), A645: 645 nm’de yapılan ölçümün absorbans değeri, A663: 633 nm’de yapılan ölçümün absorbans değeri

3.4.3 Lipit peroksidasyonu (MDA içeriği)

Lipit peroksidasyonu analizi, thiobarbitürik asit reaksiyonu sonucu oluşan thiobarbitürik asit reaktif içeriğin (TBARS) belirlenmesi temeline dayanmaktadır. 0,5 g yaprak örnekleri %0,1 trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiş ve 10000 g’de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir (4°C). Oluşan süpernatantlar (~500 ml) %20 TCA içeren 1 ml %0,5 thiobarbitürik asit ile karıştırılmıştır. Karışım 95°C’de 30 dakika boyunca inkübe edilmiş ve daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. MDA konsantrasyonu 532 nm ve 600 nm’de ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır. 600 nm’de ölçülen absorbans spesifik olmayan turbiditedir ve 532 nm’de ölçülen absorbanstan çıkartılarak gerçek MDA miktarı belirlenmiştir. MDA miktarı hesaplanırken ekstinksiyon katsayısı 155 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılmıştır (Madhava and Sresty, 2000)

3.4.4 Fotosentetik verim (Fv/Fm)

Fv/Fm değeri AHL uygulamalarından 24 saat sonra ölçülmüştür. Hıyar yaprakları ölçümden önce 15 dk karanlıkta tutulmuş ve ardından portatif klorofil floresans ölçer (Hansatech) aracılığı ile ölçülmüştür. Bütün ölçümler sirkadiyan ritimden kaynaklanabilecek farklılıkları engellemek için foto periyodun ortasında gerçekleştirilmiştir.

3.4.5 Büyüme parametrelerinin incelenmesi

AHL uygulamasından 7 ve 14 gün sonra gövde biyo kütle değerleri (yaş ve kuru ağırlık) ve yaprak alan indeksi ölçülmüştür. Hasat zamanı bitkiler kök seviyesinden kesilip gövde yaş ağırlıkları (g) tartılmıştır. Daha sonra bitkiler 65-70°C’de 72 saat boyunca etüvde tutulmuş ve kuru ağırlıkları (g) tartılmıştır. Yaprak alan indeksinin hesaplanmasında Image J paket programı kullanılmıştır. 1. ve 2. gerçek yaprakların fotoğrafları çekilmiş ve program vasıtasıyla alanları (cm²) hesaplanmıştır.

3.5 Patojen İnokulasyonu ve Hastalık Çıkışının Belirlenmesi

Bu çalışmada hıyar bitkilerinde mildiyö hastalığına neden olan *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et. Curt.) Rostov etmeni kullanılmıştır. İzmir ili Menderes ilçesindeki hıyar üretim seralarından farklı mildiyö izolatları toplanmış ve bunlar içerisinde patojenisitesi en yüksek olan izolat kullanılmıştır. Hıyar üretim alanlarından toplanan *P. cubensis* izolatı iklim odasında hıyar bitkileri üzerinde çoğaltılmış ve saklanmıştır (Tian et al., 2011). AHL uygulamasından sonra 2. Gerçek yaprağın alt yüzeyi steril su ile hazırlanmış (% 0,01 Tween 20 içeren) *P. cubensis* sporangium süspansiyonu (1×10^5 sporangium/ml) ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra bitkiler 18°C sıcaklık ve %90 oransal nem de karanlıkta 12 saat bekletilmiş ve daha sonra $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de yetiştirilmiştir. Çalışmada bakteriyel patojen olarak Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* CFBP 2262 (*Psl*) kullanılmıştır. Etmen -80'de bulunan gliserol stoktan çıkarıldıktan sonra King B besi yerinde geliştirilmiş ve O.D₆₀₀ 0,05 yoğunluğunda süspansiyon hazırlanarak bitkilere püskürtülmüştür.

3.5.1 Hastalık şiddeti üzerine AHL etkisinin değerlendirilmesi

Mildiyö çıkışı inokulasyondan sonra 8. günde değerlendirilmiştir. Hastalık şiddeti, yaprak üzerindeki enfeksiyon alanı hesaplanarak değerlendirilmiştir (Mitani et al., 2003). Yaprak yüzeyindeki hastalıklı alanın belirlenmesinde "Image J 1.48) bilgisayar yazılımı kullanılmıştır. *Psl*'nin neden olduğu lekeler inokulasyondan sonra 7. günde sayılmış ve değerlendirilmiştir.

3.5.2 AHL molekülünün *P. cubensis* virülensliği ve *Psl* proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Oxo-C14-HSL'nin *P. cubensis* virülensliği üzerine etkisi koparılmış yaprak deneyi ile yapılmıştır. Bu amaçla sağlıklı bitkilerden koparılan yapraklar nemli filtre kâğıtları içeren petri kaplarına abaxial yüzleri yukarı bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu yapraklar üzerine 5 µM konsantrasyonunda oxo-C14-HSL püskürtülmüş ve ardından *P. cubensis* (1×10^5 sporangium/ml) inokulasyonu yapılmıştır. Ağzı kapatılan petri kapları 8 gün boyunca oda koşullarında inkübasyona bırakılmış ve ardından enfekteli alanların yüzeyi ölçülmüştür. Oxo-C14-HSL'nin *Psl* proliferasyonuna etkisi in vitro olarak ölçülmüştür. Final

konsantrasyonunda 5 µM oxo-C14-HSL içeren King B besi yerlerine *Psl* ekilmiş ve 48 saat sonra koloni sayımı yapılmıştır.

3.5.3 Kantitatif Real-time polimeraz zincir reaksiyonu ile *P. cubensis* yoğunluğunun belirlenmesi

P. cubensis inokulasyonu yapılmış yapraklar inokulasyondan sonra 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde hasat edilmiştir. Hasat edilen yapraklar havan içerisinde sıvı nitrojen ile toz haline getirilmiş ve genomik DNA ticari kit (NucleoSpin® Plant II, Macherety-Nagel) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. DNA ekstraksiyonu için 150 mg toz haline getirilmiş yaprak dokusu kullanılmıştır. qPCR için 10 ng DNA ve Amplicon marka kit (RealQ Plus 2x Master Mix Green) kullanılmıştır. PikoReal™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific™) cihazı kullanılarak qPCR reaksiyonu yürütülmüştür. Enfekteli materyaldeki patojenin seviyesini ölçmek için *Pseudoperonospora cubensis* internal ara bölge (Internal transcribed spacer, ITS) primerleri kullanılmıştır (Tian et al., 2011). Değerler, hıyara özgü spesifik aktin bölgesi kullanılarak normalize edilmiştir. qPCR analizi için kullanılan parametreler şöyledir; 95°C (2dk), [95°C (15 sn), 56°C (15 sn) ve 72°C (30 sn), 40 döngü], 70°C (5dk). Oransal ekspresyon, $2^{(-\Delta Ct)}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. $-\Delta Ct$ değeri $Ct_{ITS}-Ct_{actin}$ şeklinde hesaplanmıştır. Kullanılan primerler tablo 3.1’de verilmiştir.

3.6 Bitki Savunma Süreçleri ile İlgili Parametreler

3.6.1 Reaktif oksijen türlerinin histokimyasal olarak belirlenmesi

H₂O₂’nin histokimyasal olarak belirlenmesi Thordal Christensen et al. (1997) protokolü esas alınarak, bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. 1,5 cm çapındaki yaprak diskleri 1 mg/ml konsantrasyonunda 3,3’-Diaminobenzidine (DAB) içeren 50 Mm Tris-asetat (pH 3,8) ile vakum kullanılarak infiltre edilmiş ve 25°C’de karanlık ortamda 6 saat bekletilmiştir. Süperoksitin (O₂⁻) histokimyasal olarak belirlenmesi Jabs et al. (1996)’ya göre yapılmıştır. Alınan yaprak diskleri 0,5 mg/ml konsantrasyonunda nitrotetrazolium blue chloride (NBT) içeren 25 mM K-HEPES çözeltisi (pH 7,8) ile vakum kullanılarak infiltre edilmiş ve 25°C’de karanlık ortamda 6 saat bekletilmiştir. Daha sonra DAB ve NBT solüsyonları yaprak disklerinden uzaklaştırılmış ve yerine 3:1:1 oranında etanol:asetik asit:gliserol çözeltisi eklenmiştir. İçerisinde yaprak diskleri bulunan tüpler 90±5°C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dakika tutulmuş ve çözelti değiştirilerek işlem tekrarlanmıştır. Yaprak disklerinin görüntülenmesi Olympus

UC90 kamera bağlantılı stereo mikroskop ile yapılmıştır ve fotoğraflar şeffaf arka planda, uniform ışık kaynağı kullanılarak çekilmiştir.

3.6.2 Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi

1 g titanyum dioksit (TiO_2) ve 10 g potasyum sülfat (K_2SO_4) 150 ml konsantre sülfürik asit ile hot plate üzerinde 2 saat kaynatılıp hazırlanan karışım soğutulmuş ve 1,5 lt'ye tamamlanmıştır. Bu karışım titanyum çözeltisi olarak kullanılmıştır. 0,3 g yaprak örneği 10 ml soğuk aseton ile havan içinde homojenize edilip homojenat siyah bant filtre kâğıdı ile süzölmüştür. Ekstrakt üzerine 4 ml titanyum çözeltisi ve 5 ml konsantre amonyak çözeltisi ilave edilip hidrojen peroksit-titanyum kompleksi oluşturulmuştur. Ardından 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, berrak kısım dökölmüş ve çökelti 10 ml 1 M H_2SO_4 ile çözülmüştür. Tekrar 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çözünmemiş materyal uzaklaştırılıp, 415 nm'de absorbans belirlenmiştir. H_2O_2 ile hazırlanan standart eğri ile değerlendirme yapılmıştır ve H_2O_2 miktarı nmol $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir (Brennan and Frenkel, 1977) .

3.6.3 Toplam protein miktarının belirlenmesi

0,5 gr yaprak örneği 1 mM EDTA ve %2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) içeren 4 ml 0,05 M sodyum fosfat (pH 7,8) tamponu kullanılarak sıvı azot yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenat, 40 dk boyunca 13000 g'de santrifüj (+4°C) edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar, peroksidaz enzimi aktivitesi ve protein ölçümlerinde kullanılmıştır. Tüm enzimler ve protein okumaları PG Instruments T60U (Shimadzu, Japan) marka spektrofotometre ile yapılmıştır. Yapraklardaki çözülebilir protein içeriği Bradford (1976)'a göre, 565 nm'de 1 ml'lik polistren küvetlerde ölçölmüştür. Standartlar, Bovin serum albumin (BSA) kullanılarak hazırlanmıştır. Örneklerdeki protein miktarları, standartlar kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisindeki değerler kullanılarak mg yaş ağırlık⁻¹ olarak belirlenmiştir. Protein miktarları savunma ilişkili enzim aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.6.4 Peroxidaz (POX) aktivitesinin belirlenmesi

POX aktivitesi 465 nm'de 0,15 M sodyum fosfat çözeltisinin okside olmuş DAB'a dönüşümündeki artışını ölçen Herzog and Fahimi'e (1973) göre yapılmıştır. Reaksiyon çözeltisi, DAB çözeltisi (çözönmüş jelatin solösyonu) ve

%0.6'lık H_2O_2 içerir. 465 nm'deki azalış 180 saniye boyunca takip edilmiştir ve bir ünite enzim, dakikada parçalanmış H_2O_2 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ olarak ifade edilmiştir.

3.6.5 Fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesinin belirlenmesi

Fenil alanin amonyum liyaz aktivitesini belirlemek amacıyla 500 mg yaprak örneği sıvı nitrojen ile dondurulmuştur. Yaprak tozu, 0,8 mM β -merkaptotanol ve %1 polivinilpolipirrolidon bulunan 0,5 M Tris-HCl (1:10 w:v, pH:8,8) ile homojenize edilmiştir ve 15000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant PAL aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır. PAL aktivitesi 30°C'de L-fenilalaninden trans-sinamik asit oluşumuna göre belirlenmiştir (Zucker et al., 1965). PAL aktivitesi dakikada oluşan 1 μM trans-sinamik asittir. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirtilmiştir.

3.6.6 β -1,3-glukanaz aktivitesinin belirlenmesi

1 gr yaprak örneği sıvı azot aracılığı ile toz haline getirilmiş ve daha sonra 5 ml 50 mM sodyum asetat (pH 5,0) ile havan içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat 15000 g'de 20 dk (4°C) santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant β -1,3-glukanaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Enzim aktivitesi Abeles et al. (1971)'un protokolü baz alınır, bazı modifikasyonlar yapılarak ölçülmüştür. 1 ml ekstrakt, %4 kontrastiyonda laminarin (Sodyum asetat tamponu ile hazırlanmış) ile 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon, örnekler kaynayan suda 5 dk tutularak durdurulmuş ve örneklerin üzerine 250 μl 3,5-dinitrosalisilik eklenerek absorbanları 540 nm'de spektrofotometre aracılığı ile ölçülmüştür. β -1,3-glukanazın spesifik aktivitesi mg protein başına ünite olarak ifade edilmiştir. Bir ünite, bir saatte 1 μmol glukoz oluşumunu katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.6.7 Fenolik bileşiklerin ve lignin içeriğinin belirlenmesi

P. cubensis inokulasyonu yapılmış yapraklar inokulasyondan 24, 48 ve 72 saat sonra toplanmış ve sıvı azotta toz haline getirilmiştir. Bu bitki tozundan 50 mg alınmış ve ışık geçirmeyen 2 ml'lik eppendorf tüplere konmuştur. Bu tüpler üzerine 2 ml %80 (v/v) metanol konulmuş ve ortalama 150 rpm hızda, oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 13000 g'de 10 dakika boyunca (4°C) santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz tüplere aktarılmıştır. Tüplerde kalan pellet tekrar 2 ml %80'lik metanol ile 1 saat inkübe edildikten

sonra santrifüj edilerek elde edilen süpernatant bir önceki ile birleştirilmiştir. Böylece çözünebilir fenolik bileşikler ekstrakte edilmiştir. Hücre duvarına bağlı fenoliklerin ekstraksiyonu için eppendorf tüpleri içerisinde kalan pellet sırasıyla 1 ml methanol (%80), distile su ve aseton ile yıkanmıştır. Her bir adımda 15 dk inkübasyon yapılmış ve inkübasyon sonrası 10 dk santrifüj (13000g) yapılarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. En son yapılan aseton yıkamasından sonra örnekler çeker ocak altında kurumaya bırakılmıştır. Ardından alkalın hidrolizi için kurutulmuş pelletler üzerine 1 ml 1 M NaOH eklenmiş ve 80°C’de 1 saat bekletildikten sonra oda koşullarında ertesi güne kadar tutulmuştur. İnkübasyondan sonra tüplere 100 µl %86’lık fosforik asit (H₃PO₄) eklenerek pH düşürülmüştür. Hücre duvarına bağlı fenolik bileşikler çözme amacıyla 500 µl etil asetat eklenmiş ve oda koşullarında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. 13000g’de 5 dk santrifüjden sonra tüp içerisinde oluşan üst faz (yaklaşık 400-500 µl) yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplerde kalan örnek üzerine tekrar 500 µl etil asetat eklenerek işlemler tekrarlanmış ve elde edilen süpernatant bir önceki ile birleştirilmiştir. Böylece hücre duvarına bağlı fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Fenol içerikleri, Folin-Ciocalteu reaktifinin eklenmesinden sonra spektrofotometrede 725 nm’de ölçülerek belirlenmiştir. Sonuçlar gram yaş ağırlık başına düşen mg gallik asit olarak ifade edilmiştir. Lignin ekstraksiyonu için fenol ekstraksiyonundan kalan örnekler üzerine 500 µl %80’lik methanol eklenmiş ve ardından tüpler 13000g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak kalan pellet daha önceden de belirtildiği gibi 1 ml methanol (%80 v/v), dH₂O ve aseton ile yıkanmış ve son aşamadan sonra kurutulmuştur. Kuru pelletler üzerine 1,5 ml 2M HCl ve 0,3 ml tiyoglikolik asit eklenmiştir ve 95°C derecede 4 saat inkübe edilmiştir. Tüpler buz üzerinde soğutulduktan sonra santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml 0,5 M NaOH eklenmiş ve çalkalayıcıda (120 rpm) ertesi güne kadar bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler 13000 g’de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz tüplere aktarılmıştır. Kalan pellet üzerine 0,5 ml NaOH eklenmiş ve tekrar santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant bir önceki ile birleştirilmiştir. Daha sonra 300 µl %32’lik HCl eklenmiş ve 4 saat boyunca 4°C’de çalkalayıcıda tutulmuştur. İnkübasyon sonunda santrifüj yapıp süpernatant uzaklaştırılmış ve kalan pellet 600 µl M 0,5 NaOH ile çözülmüştür. Ligninin miktar tayini, uygun seyreltmeden sonra 340 nm’de absorbans ölçülerek gerçekleştirilmiştir ve mg lignin g⁻¹ yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir (Schenk and Schikora, 2015a).

3.6.8 Kalloz miktarının belirlenmesi

Kalloz birikiminin görüntülenmesi için enfekte hıyar yapraklarından alınan 1,5 cm çapındaki diskler içerisinde 1:3 oranında (v/v) asetik asit:ethanol içeren tüplere konulmuş ve klorofilin tamamen uzaklaşarak yaprak renginin transparan hale gelmesi için 24 saat bekletilmiştir. Rengi açılan yapraklar 150 mM K_2HPO_4 içerisinde 30 dk bekletilmiş ve ardından %0,01 anilin mavisi içeren 150 mM K_2HPO_4 içerisinde boyanmıştır. Anilin mavisinin ışığa toleransı olmaması nedeniyle tüpler inkübasyon süresince ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Boyama sonucu kalloz birikimi DAPI filtresi kullanılarak Olympus IX-53 marka inverted floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. Anilin mavisi için optimum ekstinksiyon dalga boyu 370 nm, emisyon dalga boyu ise maksimum 509 nm'dir (Flors et al., 2007)

3.7 Savunma ve Sinyalleşme İlişkili Transkript Değişim Seviyelerinin Belirlenmesi

Gen ekspresyon analizleri için priming uygulamalarından ve *P. cubensis* inokulasyondan sonra 0., 3., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde yaprak örnekleri toplanmış ve sıvı azotta dondurulduktan sonra analize kadar $-80^{\circ}C$ 'de depolanmıştır. Total RNA izolasyonu için her bir bitki dokusu örneği steril ve önceden sıvı azotta soğutulmuş havanlara yerleştirilmiştir. Örnekler, üzerlerine sıvı azot dökülerek havaneli yardımıyla toz haline getirilmiştir. Elde edilen toz halindeki homojenize doku yine sıvı azotla soğutulan steril Rnaz içermeyen mikro santrifüj tüplerine (1,5 ml) 200 mg olacak şekilde aktarılmıştır. Her bir pürifikasyon prosedürü için %1'lik 2-Merkaptoetanol içeren taze lizis tamponu hazırlanmıştır. 200 mg doku içeren tüplere 1 ml %1'lik 2-merkaptoetanol içeren taze lizis tamponu eklenmiş ve 3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12.000 g'de 2 dk santifüjlenerek süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan total RNA izolasyonu PureLink RNA Mini Kit (Thermofischer, 12183020) adlı ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA'nın kolondan elde edilmesi için 50 μ l Rnaz içermeyen ddH₂O kullanılmıştır ve elde edilen RNA $-80^{\circ}C$ 'de saklanmıştır. Total RNA izolasyonu yapılan örneklerdeki RNA konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop (Thermofisher, 2000/2000c UV-Vis) ile belirlenmiştir. Karışımın absorpsiyonu 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçülmüştür. RNA izolasyonunun kalitesinin belirlenmesinde A_{260}/A_{280} oranı kullanılmıştır. Bu oranın 1,6-2 arasında olması izolasyonun doğru şekilde yapıldığını göstermektedir. Total RNA konsantrasyonu da aşağıdaki denklemden

yararlanılarak tespit edilmiştir. Total RNA konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)= $[A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times \text{RNA koeffiensi}]/1000$ (Seyreltme faktörü: 80, RNA koeffiensi: 40).

Elde edilen total RNA'dan cDNA sentezi için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermofischer, K1622) adlı ticari kit kullanılmıştır. Kalıp olarak kullanılacak total RNA konsantrasyonu 2,5 μg olacak şekilde belirlenmiştir. cDNA sentezi için gereken reaksiyon ortamının içeriği şöyledir; 5X Reaksiyon tamponu (4 μl), RiboLock Rnaz Inhibitörü (20 U/ μl) (1 μL), 10 mM dNTP karışımı (2 μl), RevertAid M-MuLV Revers transkriptaz enzimi (200 U/ μl) (1 μL ve Rnaz içermeyen H_2O (Final hacim 20 μl). Reaksiyon parametreleri 60 dk 42°C ve 5 dk 70°C olacak şekilde dizayn edilmiştir ve amplifikasyonda Applied Biosystems™ LS4375786 marka thermal cycler cihazı kullanılmıştır. Elde edilen cDNA -80°C'de saklanmıştır.

Kantitatif Real Time PCR analizi, ThermoPiko Real 2.2 (96 kuyucuklu) Real Time PCR cihazı ve yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA 1:5 oranında seyreltilerek kantitatif real-time PCR için kalıp olarak kullanılmıştır. Real Time PCR için syber green master mix (RealQ Plus Master Mix Green, Amplikon) kullanılmıştır. PCR reaksiyonu 1 μl seyreltilmiş cDNA (1:5), 9,5 μl dH₂O su, 1 μl forward primer ve 1 μl reverse primer eklenerek hazırlanmıştır. Son olarak 12,5 μl 2X SYBR Green Master Mix ilave edilerek tüpler mikrosantrifüjde 5000 g'de 30 saniye döndürülmüştür. Floresans ölçümünü etkilediği için tüpler içerisinde kabarcık kalmamasına dikkat edilmiştir. Reaksiyon parametreleri aşağıdaki gibidir;

- | | | |
|------|-------------------|------------|
| i. | 95°C'de 15 dakika | |
| ii. | 95°C'de 15 saniye | } 40 döngü |
| iii. | 60°C'de 30 saniye | |
| iv. | 72°C'de 30 saniye | |
| v. | 95°C'de 5 dk | |

PCR ürünlerinin varlığı ve saflık kontrolleri erime eğrisi analizleriyle yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan primerlerin bir kısmı referans çalışmalardan alınırken bir kısmı da OligoAnalyzer ve NCBI Primer blast programları kullanılarak tarafımızdan dizayn edilmiştir (Tablo 3.1).

Gen ekspresyon değışikliğı 3 replikanın ortalama CT değęerlerine göre değęerlendirilmiřtir. Gen ekspresyonlarındaki kat değiğimi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak (Livak and Schmittgen, 2001) belirlenmiştir ve bu denklemdeki normalizasyon için housekeeping gen olan β -aktin kullanılmıştır. Kat değiğimlerinin normalizasyonu patojen olan gruplarda *P. cubensis* uygulamasından sonra 0. saatteki değęerlere, patojen olmayan gruplarda ise AHL uygulamasından sonra 0. saatteki değęerlere göre yapılmıştır.

Tablo 3.1 Primer listesi

Gen Adı	NCBI ID no	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Referans
<i>ITS</i>	-	CGGGGGTTTTGTTTGCGCGT	CGAAGCCCAAACGCTCGCCA	Tian et al., 2011
<i>Actin</i>	XM_011659465.1	TGCTGGATTCTGGTGATGGTGTGA	GGCAGTGGTGGTGAACAT	Burkhardt and Day, 2015
<i>RBOH</i>	FJ036897	AAGGTTGCTGTTTATCC	AATGGTCTTGAGTTGGG	Xia et al., 2009
<i>WRKY50</i>	XP_004144271	AACCAGCACCTCACTACG	GGATTGGGGCTCTTCTTC	Luan et al., 2019
MAPK3	Csa1M479630.1	TATTCCAGGCAGGGATC	TTGCTAATGGCTGACGAG	Wang et al., 2015
<i>PR1</i>	DQ641122.1	TGGGAAATATGGCGATGGCA	GTCTTGAGGTGAGTCTGTCCC	Tarafımızdan tasarlanmıştır
<i>PR2</i>	XM_008445504.2	TCTTGGTCTTCTGTGCC	GAGCATCAAGTGAACCTC	Luan et al., 2019
<i>PAL</i>	AF475285.1	GGCCCTAGTCGAGACCATT	CTACCATGCGCTTCACCTCA	Tarafımızdan tasarlanmıştır
<i>NPRI</i>	XM_011651416.1	CGCTTTGGTGAGGAGTTT	CAAGATTACAACAAGGGT	Luan et al., 2019
<i>ICS2</i>	XM_011661676.1	GTTCCAATCCAACAACGAAT	CTTGATAGACGCCCAATCG	Luan et al., 2019
<i>LOX</i>	XM_004135257	TCAACTGTCTCAGATCCGCT	CCTTCAACCTCCCAGCAGAG	Tarafımızdan tasarlanmıştır
<i>COII</i>	XM_004150179	TTGGACGCTCTTGCAGGAAT	CTCAAGCGCTGTGTTGTTC	Tarafımızdan tasarlanmıştır

3.8 İstatistiksel analizler

Analizler sonucu elde edilen veriler en az 2 bağımsız denemenin ve 6 ile 30 arasında değiğen teknik replikaların sonucudur. Analizler sonucu elde edilen veriler, SPSS (V18.0) istatistik paket programı ile tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuştur ve gruplar arasındaki önemli farklar Duncan testi ile belirlenmiştir. İkili gruplar kendi aralarında “Student’s *t* test” kullanılarak GraphPad paket

programı ile analiz edilmiştir. Grafiklerdeki hata çubukları ortalama $\pm$ hatayı (S.H)'yı göstermektedir.

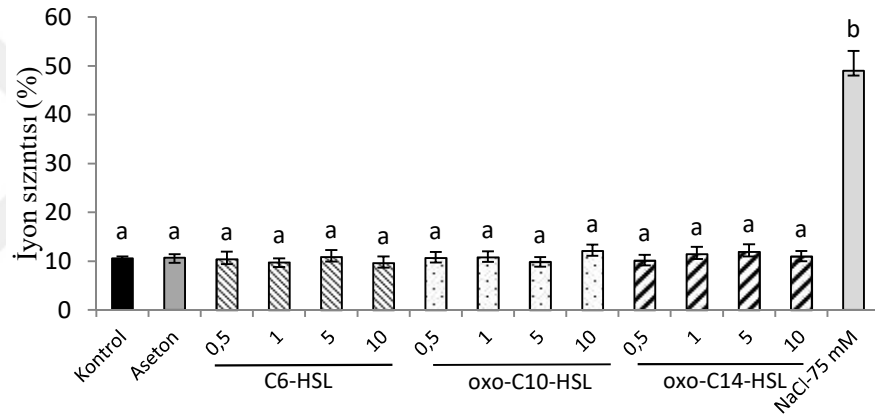


4. BULGULAR

4.1 AHL Moleküllerinin Fitotoksisite Açısından Değerlendirilmesi

4.1.1 İyon sızıntısı (Membran Zararlanma İndeksi)

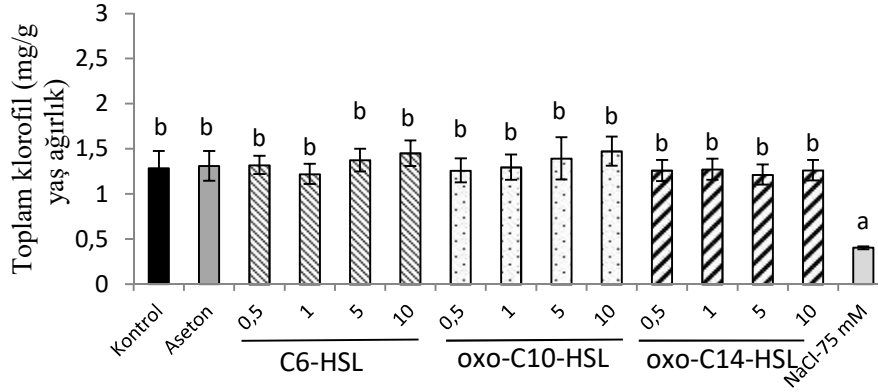
Kullanılan AHL molekülleri ve konsantrasyonlarının bitki gelişimi üzerinde herhangi bir hasara neden olup olmadığını test etmek amacıyla AHL uygulamasından 72 saat sonra yapraklarda iyon sızıntısı ölçümü yapılmıştır. Uygulanan tüm AHL molekülleri ve dozları kontrol ve aseton kontrol grubu ile benzer iyon sızıntısı değerleri (%10) göstermiştir. Hasar değerini karşılaştırmak için 75 mM NaCl uygulanan grupta membran hasarı %49 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 AHL moleküllerinin membran permeabilitesi üzerine etkileri *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir ($p < 0,05$).

4.1.2 Toplam klorofil içeriği

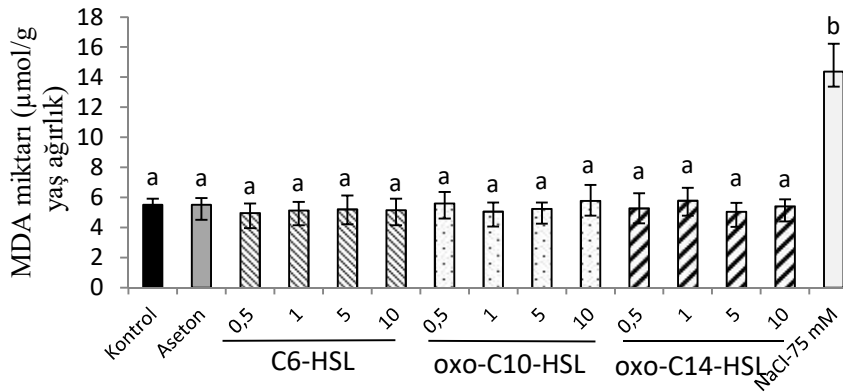
AHL'lerin bitki üzerinde fitotoksik bir etkisi olup olmadığını araştırmak için baktığımız bir diğer parametre toplam klorofil içeriğidir. Klorofil ölçümleri AHL uygulamalarından 72 saat sonra yapılmıştır. C6-HSL, oxo-C10-HSL ve oxo-C14-HSL uygulamalarının denenen dozlarının bitki klorofil içeriği üzerinde olumsuz etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.2). Tüm uygulamalarda ve kontrol gruplarında ortalama olarak $1,25 \text{ mg g}^{-1}$ yaş ağırlık klorofil miktarı bulunmuştur. Hasar değerini karşılaştırmak için 75 mM NaCl uygulanan grupta klorofil içeriği %68,2 düşmüştür.



Şekil 4.2 AHL uygulamalarının toplam klorofil içeriği üzerine etkileri *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir ($p < 0,05$).

4.1.3 Lipit peroksidasyonu (Malondialdehit miktarı)

Denenen AHL konsantrasyonlarının lipit peroksidasyonu üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.3). Uygulamalardan 72 saat sonra MDA miktarı ortalama olarak $5-6 \mu\text{mol g}^{-1}$ yaş ağırlık ölçülmüştür. 75 mM NaCl uygulamasında MDA içeriği uygulamalara göre yaklaşık 3 kat fazla bulunmuştur.

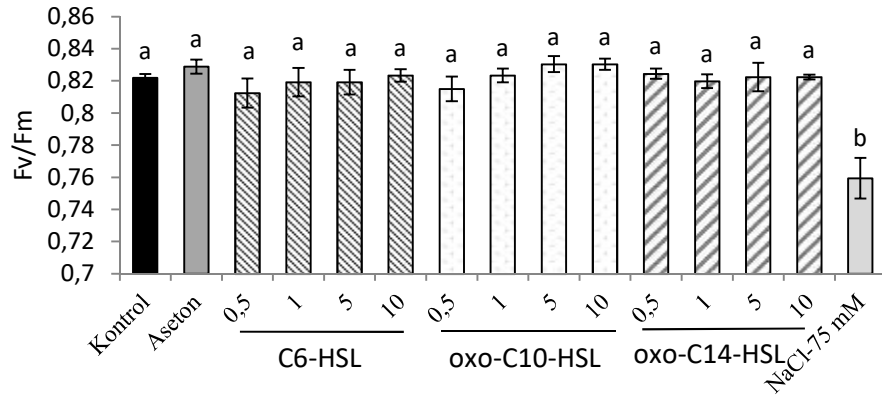


Şekil 4.3 AHL uygulamalarının yaprak MDA içeriği üzerine etkileri *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir ($p < 0,05$).

4.1.4 Fotosentetik verim (F_v/F_m)

AHL uygulamalarının fotosentez etkinliği üzerine etkilerini araştırmak amacıyla uygulamalardan 72 saat sonra fotosistem II'deki kuantum verimi ölçülmüştür. AHL uygulamaları ve kontrol grupları arasında F_v/F_m değerinde

istatistiksel olarak bir değişim gözlenmezken NaCl uygulaması %8,53 azalışa neden olmuştur (Şekil 4.4)



Şekil 4.4 AHL uygulamalarının Fotosistem II'deki maksimum kuantum verimi (Fv/Fm) üzerine etkileri *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir (p<0,05).

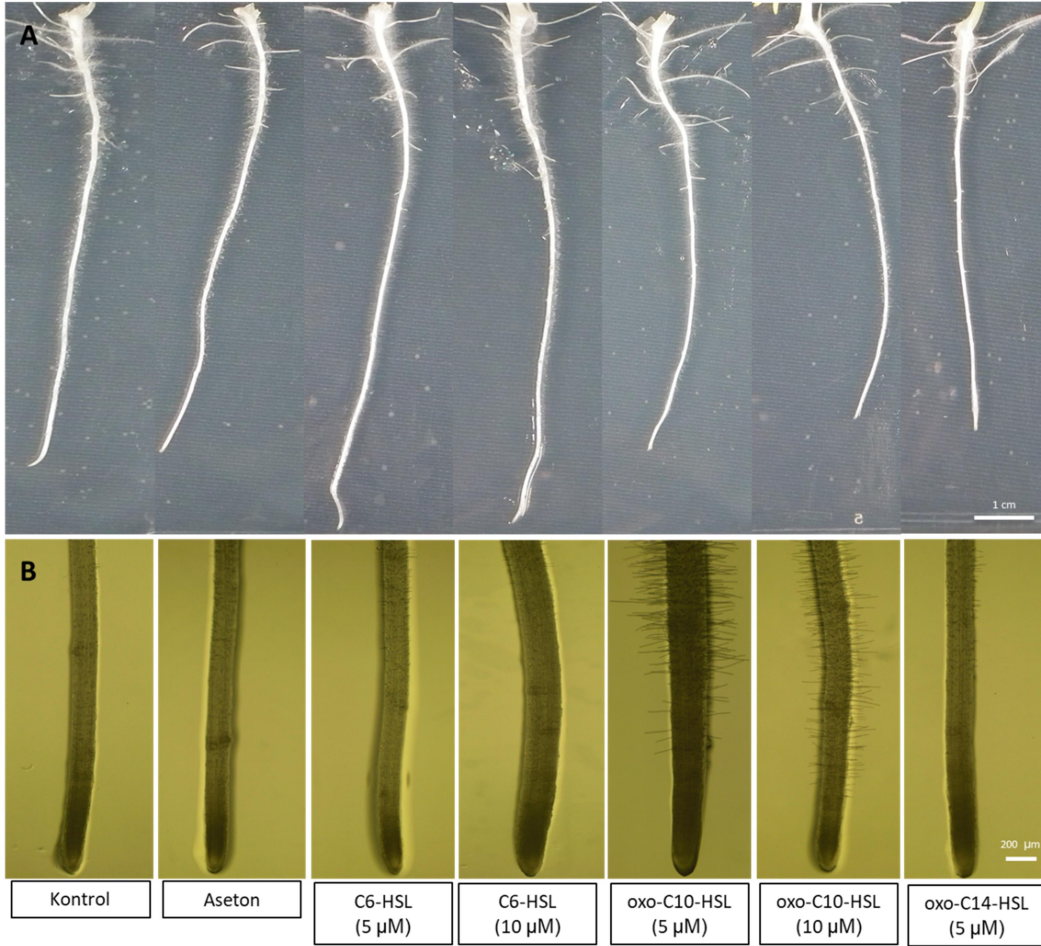
4.2 AHL Uygulamalarının Bitki Büyümesi ve Gelişimi Üzerine Etkileri

4.2.1 Kök yapısı

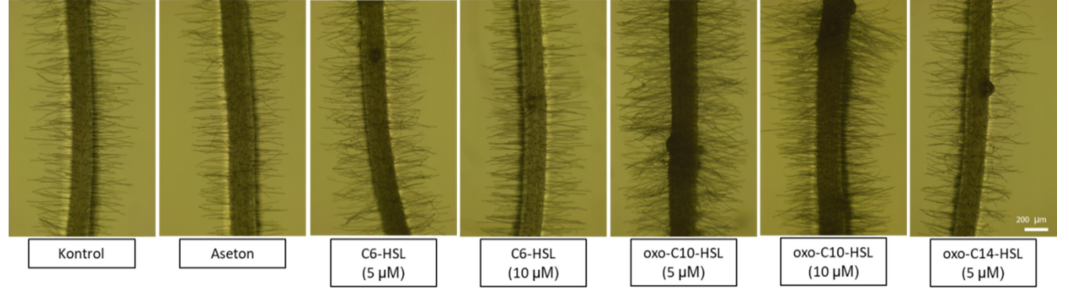
AHL moleküllerinin bitki kök yapısı ve gelişimi üzerine olan etkileri MS ortamında değerlendirilmiştir. Tohum ekiminden 6 gün sonra kök yaş ağırlığı, primer kök uzunluğu, lateral kök sayısı, kök ucu tüy yoğunluğu (2 mm), kök tüyü yoğunluğu (kök uzundan 1 cm uzaklıkta 1 mm alanda), kök tüyü uzunluğu ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.5, Tablo 4.1). Kısa zincirli olan C6-HSL molekülünün 5 μ M ve 10 μ M dozları kök yaş ağırlığında sırasıyla %11,6 ve %12,7 artışa neden olmuştur. 5 μ M ve 10 μ M oxo-C10-HSL uygulamaları kontrole göre ağırlık artışına neden olsa da istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Kök yaş ağırlığına paralel olarak C6-HSL molekülünün 5 μ M ve 10 μ M dozları primer kök uzunluğunda sırasıyla %14,5 ve %14,13 artışa neden olmuştur. Diğer AHL moleküllerinin ve dozlarının kök uzaması üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır. AHL uygulamalarının lateral kök sayısı üzerine etkilerine bakıldığında 5 μ M ve 10 μ M dozunda uygulanan oxo-C10-HSL molekülünün lateral kök sayısında artışa neden olduğu görülmektedir. Kontrol bitkilerinde ortalama olarak 9,6 lateral kök oluşurken, oxo-C10-HSL'nin 5 μ M dozunda 14,3, 10 μ M dozunda ise 13,4 lateral kök oluşmuştur.

Kök tüyü yoğunluğu ölçümleri kökün iki farklı bölgesinde yapılmıştır. Kök ucundan 2 mm uzaklığa kadar olan mesafede yapılan ölçümler oxo-C10-HSL'nin

5 μM ve 10 μM dozlarının sırasıyla %346,5 ve %282,9 oranında artışa, kök ucundan 1 cm uzaklıktaki 1 mm alanda yapılan ölçümler ise %30,9 ve %34,06 oranında artışa neden olmuştur. Ayrıca oxo-C10-HSL'nin daha düşük uygulama dozları da kök tüyü oluşumunu teşvik etmiştir. Kök tüyü uzunluklarının ölçümü, oxo-C10-HSL molekülünün 5 μM ve 10 μM dozlarına maruz kalmış bitkilerin sırasıyla %31,3 ve %26 oranında daha uzun kök tüyüne sahip olduklarını göstermiştir (Şekil 4.6). Kök fenotipi ile ilgili yapılan ölçümler aseton ve kontrol grupları arasında tüm parametreler açısından bir farklılık olmadığını ortaya koymuştur. Buna ek olarak uzun karbon zincirli oxo-C14-HSL molekülünün denenen dozlarının bitki kök büyümesi ve gelişimi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.5 MS ortamında AHL moleküllerinin bitki kök yapısı ve gelişimi üzerine etkileri A) Bitki kök boyu ve lateral kök sayısı, çizgi bar: 1 cm, B) Kök ucundaki kök tüyü yoğunluğu, çizgi bar:200 μm .



Şekil 4.6 MS ortamında AHL moleküllerinin kök tüyü yoğunluğu üzerine etkileri, çizgi bar: 200 μm .

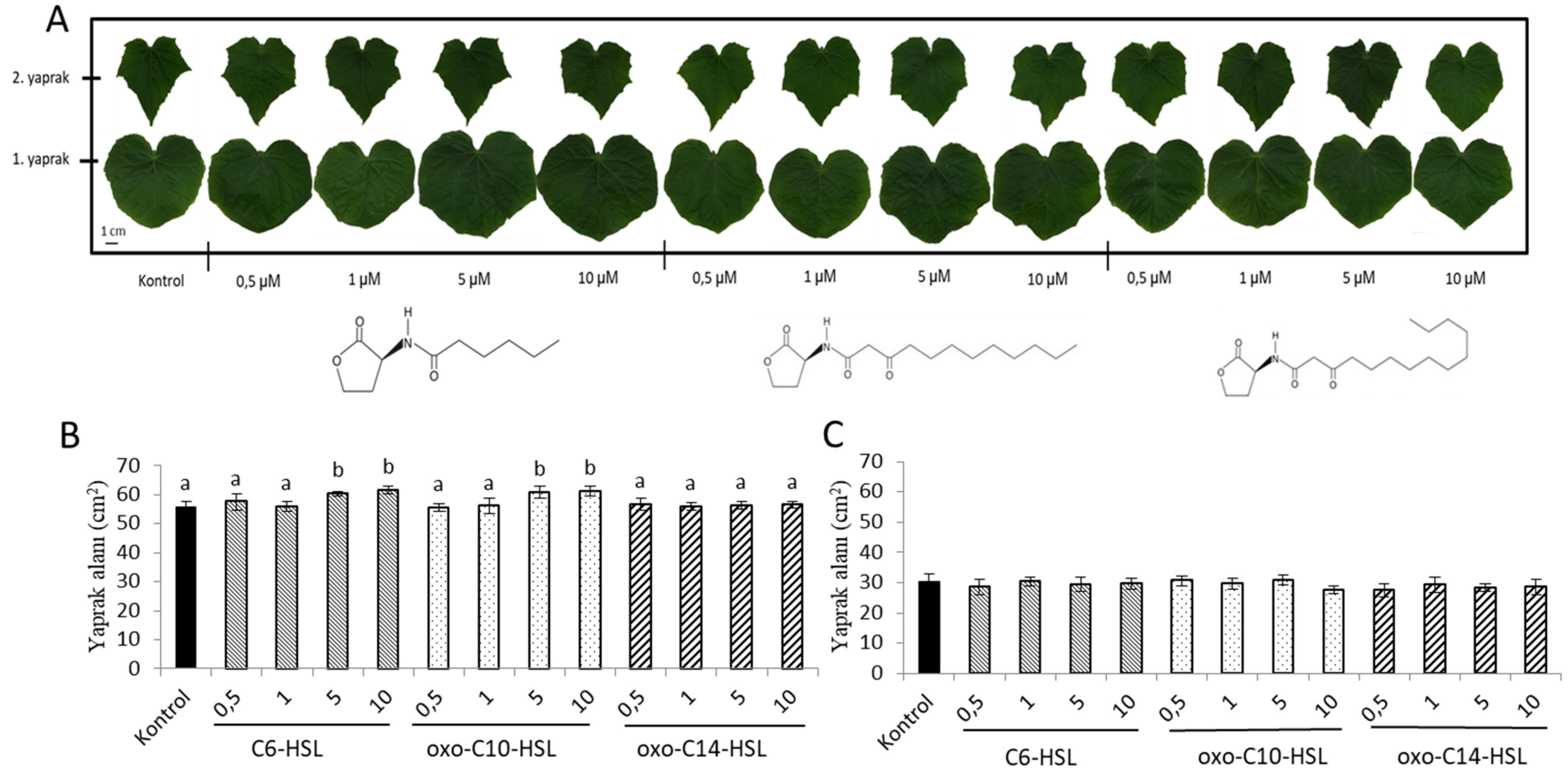
Tablo 4.1 AHL moleküllerinin kök fenotipi üzerine etkileri

AHL	Doz	Kök yaş ağırlığı (g)	Primer kök uzunluğu (cm)	Lateral kök sayısı	Kök tüyü Yoğunluğu#	Kök tüyü Yoğunluğu#	Kök tüyü uzunluğu (µm)
Kontrol	-	0,0722±0,006 ^a	8,179±0,19 ^a	9,6±0,92 ^a	24,7±4,96 ^a	155±13,3 ^{ab}	315,3±17,1 ^a
Aseton	-	0,071±0,009 ^a	8,291±0,22 ^a	9,9±1,22 ^a	24,6±5,62 ^a	153,7±17,5 ^{ab}	325,6±25,4 ^a
C6-HSL	0,5 µM	0,0709±0,010 ^a	8,251±0,18 ^a	10±1,41 ^a	28,8±7,05 ^a	162±6,9 ^{ab}	330,9±30 ^a
	1 µM	0,0718±0,012 ^a	8,299±0,24 ^a	9,8±1,08 ^a	27,4±6,62 ^a	156±15,6 ^{ab}	332,4±30,8 ^a
	5 µM	0,0806±0,011 ^b	9,369±0,29 ^b	10,2±0,98 ^a	33,3±7,17 ^a	159,7±10,9 ^{ab}	323,3±29,7 ^a
	10 µM	0,0814±0,010 ^b	9,335±0,33 ^b	9,7±0,64 ^a	30,4±7,47 ^a	153,3±16,1 ^{ab}	337,8±27,9 ^a
oxo-C10-HSL	0,5 µM	0,0703±0,011 ^a	8,321±0,27 ^a	10,4±1,43 ^a	30,7±6,54 ^a	163,7±12,9 ^b	321,8±21,7 ^a
	1 µM	0,0725±0,013 ^a	8,298±0,20 ^a	10,6±1,69 ^a	33±6,71 ^a	160,1±12,1 ^{ab}	320,1±31 ^a
	5 µM	0,075±0,009 ^a	8,271±0,31 ^a	14,3±1,19 ^b	110,3±13,85 ^c	202±9 ^c	414,1±20,6 ^b
	10 µM	0,0756±0,007 ^a	8,294±0,36 ^a	13,4±1,69 ^b	94,6±12,90 ^b	207,8±11,1 ^c	397,3±12,8 ^b
oxo-C14-HSL	0,5 µM	0,0701±0,014 ^a	8,384±0,31 ^a	9,9±1,30 ^a	32,7±7,91 ^a	149,6±13,7 ^{ab}	320,5±20,5 ^a
	1 µM	0,0699±0,014 ^a	8,064±0,48 ^a	10,6±1,91 ^a	31,7±6,51 ^a	151,7±14,9 ^{ab}	322,9±25,3 ^a
	5 µM	0,0711±0,015 ^a	8,295±0,33 ^a	10,8±1,54 ^a	29,4±7,49 ^a	150±12,5 ^{ab}	323,7±17 ^a
	10 µM	0,0714±0,014 ^a	8,115±0,59 ^a	10,5±1,80 ^a	29,2±5,49 ^a	148,3±13,4 ^a	331,8±19,5 ^a

#Kök ucundan 2 mm uzunluğa kadar mesafe

*Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir (p<0,05).

#Kök ucundan 2 cm uzaklıktaki 1 mm mesafe



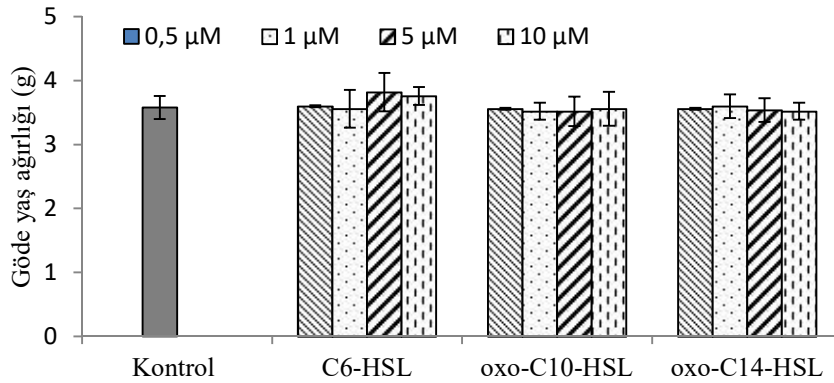
Şekil 4.7 AHL moleküllerinin yaprak alanı üzerine etkileri A) Yaprak alanlarını gösteren fotoğraf, B) İlk gerçek yaprağın alanı, C) İkinci gerçek yaprağın alanı, *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir ($p < 0,05$).

4.2.2 Yaprak alan indeksi

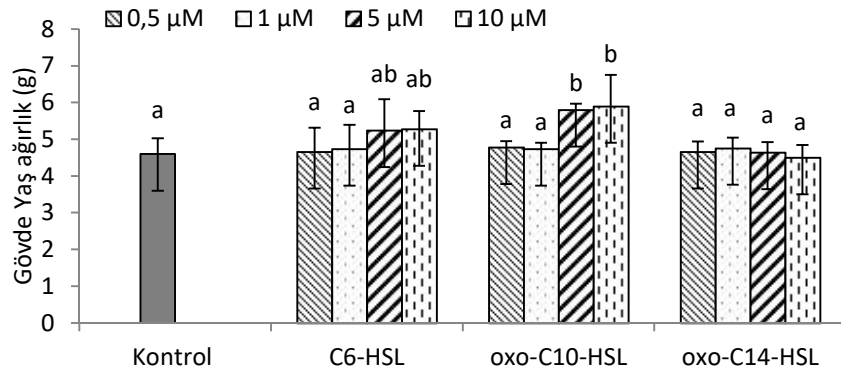
AHL uygulamalarının bitki gelişimi üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla AHL uygulamasından sonra 15. günde 1. gerçek ve 2. gerçek yaprak alanları ölçülmüştür. C6-HSL ve oxo-C10-HSL'nin 5 ve 10 μ M dozları 1. gerçek yaprak alanının artışına neden olmuştur. Meydana gelen artış ortalama olarak %10 kadardır. AHL uygulamalarının ikinci gerçek yaprak alanına herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.7).

4.2.3 Gövde yaş ağırlığı

AHL moleküllerinin bitki gelişimi üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla bitkilerin yaş ve kuru ağırlıkları 7. ve 14. günlerde tartılmıştır. C6-HSL molekülünün 5 μ M dozu 7. günde kontrole göre %6,7, 10 μ M dozu ise %5 oranında artışa neden olmuştur. Ancak bu artışlar istatistiksel olarak önemli değildir. 14. günde yapılan ölçümlerde ise C6-HSL'nin 5 μ M dozu %13,9, 10 μ M dozu ise %14,7 artışa neden olduğu gözlenmiştir. Oxo-C10-HSL ise 7. günde gövde yaş ağırlığında herhangi bir etki meydana getirmezken 14. günde 5 μ M dozu %26, 10 μ M dozu ise %28,5 artış sağlamıştır. Uzun karbon zincirli AHL molekülü her iki ölçüm zamanında da kontrol ile aynı istatistiksel grup içinde bulunmuştur.



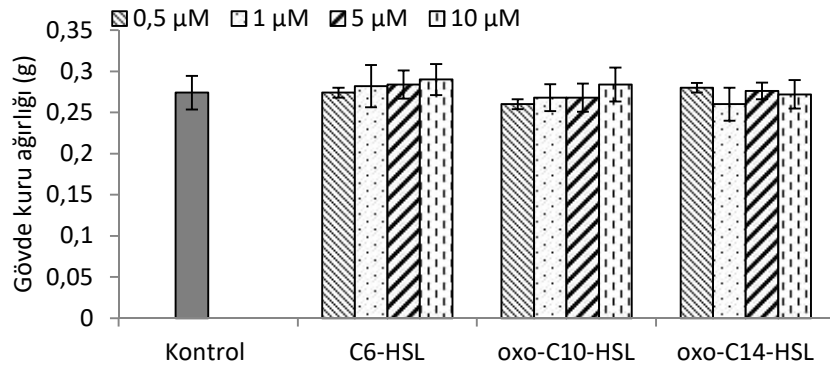
Şekil 4.8 AHL moleküllerinin gövde yaş ağırlığı üzerine etkileri (7. gün) *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir ($p < 0,05$).



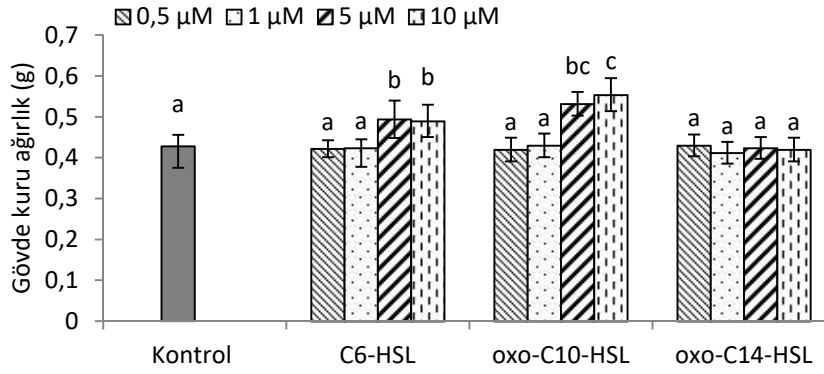
Şekil 4.9 AHL moleküllerinin gövde yaş ağırlığı üzerine etkileri (14. gün) *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir ($p<0,05$).

4.2.4 Gövde kuru ağırlığı

AHL moleküllerinin denenen dozlarının 7. günde gövde kuru ağırlığı üzerine bir etkisi gözlenmemiştir. 14. günde yapılan ölçümler kısa karbon zincirli AHL molekülünün 5 µM ve 10 µM dozlarının kontrole göre yaklaşık %15, oxo-C10-HSL'nin ise 5 µM dozunun %24,2, 10 µM dozunun %29 artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Oxo-C14-HSL'nin ise denenen dozlarının gövde kuru ağırlığı üzerinde bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.10 AHL moleküllerinin gövde kuru ağırlığı üzerine etkileri (7. gün) *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.11 AHL moleküllerinin gövde kuru ağırlığı üzerine etkileri (14. gün) *Gruplar arasındaki farklılıklar küçük harflerle gösterilmiştir ($p < 0,05$).

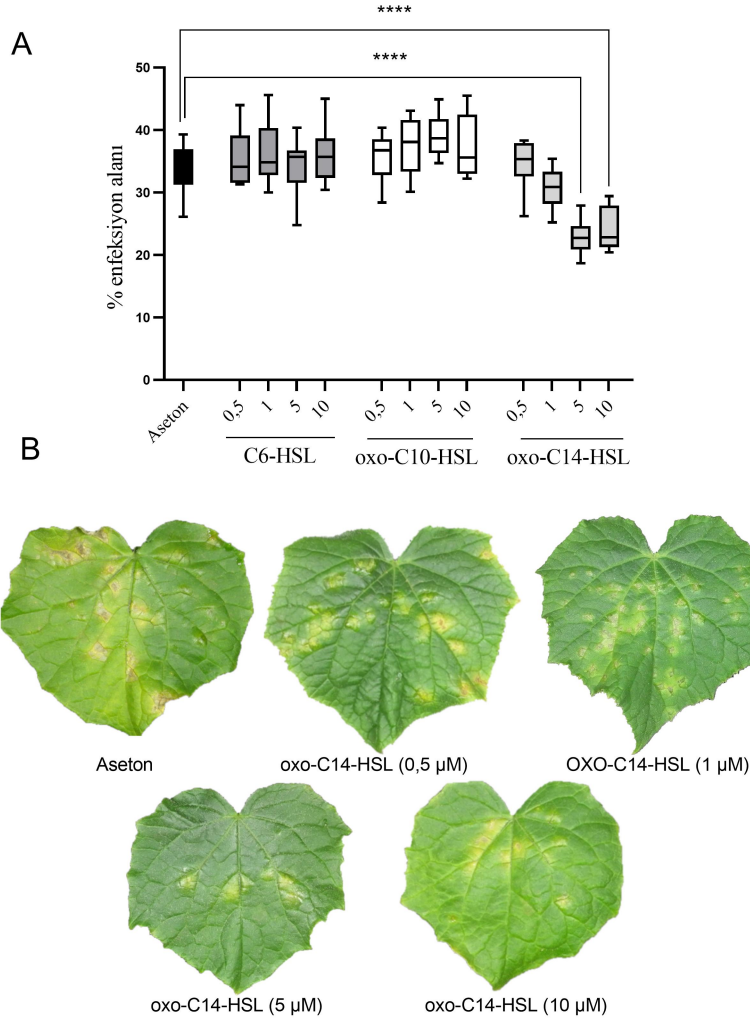
4.3 AHL Uygulamalarının Bitki Savunma Sistemi Üzerine Etkileri

Literatürdeki çalışmalarda belirtildiği gibi bitkilerin AHL moleküllerine karşı oluşturdıkları cevaplar kullanılan AHL molekül tipine, açıl zinciri uzunluğuna, doza ve inkübasyon süresine göre farklılıklar göstermektedir. Çalışmanın birinci aşamasında C6-HSL'nin kök uzamasını ve oxo-C10-HSL'nin kök fenotipi değişimini (yanal kök oluşumu, kök tüyü yoğunluğu gibi) tetiklediği bulunmuştur. Çalışmanın ikinci aşamasında ise *P. cubensis*'e karşı sistemik dayanıklılığı en etkili şekilde uyaran AHL molekülü ve dozu belirlenmiştir. Ayrıca seçilen bu molekülün *Cucumis sativus*-*Pseudoperonospora cubensis* etkileşimini nasıl etkilediği ortaya konmuştur.

4.3.1 Hıyar mildiyösüne karşı sistemik dayanıklılığı uyaran AHL molekülünün ve dozunun seçimi

Hidroponik olarak yetiştirilen hıyar bitkileri ana gövde üzerinde 2. yaprağın belirttiği dönemde (hidroponik sisteme aktarıldıktan ~18 gün sonra) besin çözeltisi içerisinde 0,5, 1, 5, 10 µM dozlarında C6-HSL, oxo-C10-HSL, oxo-C14-HSL uygulanmıştır. AHL molekülleri aseton içerisinde çözülüp uygulandığından kontrol grubu olarak aseton uygulaması yapılmıştır. Uygulamadan 72 saat sonra besin çözeltisi AHL içermeyen yeni çözelti ile değiştirilmiş ve ardından 1×10^5 sporangium/ml yoğunluğunda *P. cubensis* inokulasyonu yapılmıştır. İnokulasyondan 8 gün sonra hastalık çıkışı değerlendirilmiştir. Kontrol bitkilerinde enfeksiyon alanı %34 bulunmuştur. Kısa zincirli AHL molekülü olan C6-HSL'nin 0,5 µM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM dozlarının uygulandığı bitkilerde

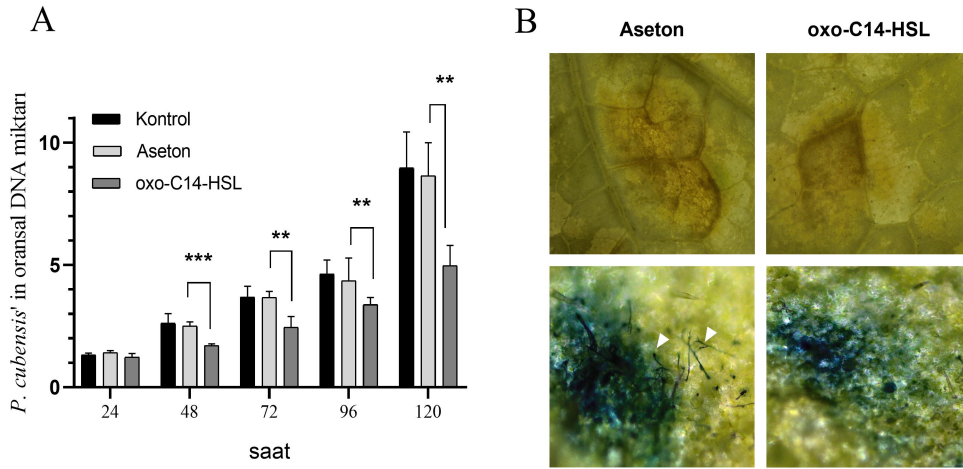
sırasıyla %35,7, %36,3, %34,3 ve %36 enfeksiyon alanı ortaya çıkmıştır. Oxo-C10-HSL'nin 0,5 μ M dozunda %35,8, 1 μ M dozunda % 37,4, 5 μ M dozunda %38,9, 10 μ M dozunda ise %37,6 hastalık çıkışı gözlenmiştir. Her iki molekülün tüm dozları aseton (kontrol) ile aynı istatistiksel grupta bulunmuştur. Oxo-C14-HSL'nin en düşük konsantrasyonu hastalık çıkışı üzerine herhangi bir etki göstermezken, 1 μ M dozu %10, 5 μ M dozu %32,64, 10 μ M dozu ise %28,82 enfeksiyon azalışına neden olmuştur (Şekil 4.12). Bu sonuçlara göre bitki sistemik dayanıklılığını en başarılı şekilde uyarıcı 14 karbonlu AHL (oxo-C14-HSL)'nin 5 ve 10 μ M dozlarıdır. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında priming molekülü olarak oxo-C14-HSL (5 μ M dozu) kullanılmıştır.



Şekil 4.12 Hastalık şiddetinin (*P. cubensis*) değerlendirilmesi A) Etmenin neden olduğu enfeksiyon alanının büyüklüğü B) Hastalık şiddetine ait fotoğraflar, Student's *t* testine göre **** ($p < 0,0001$).

4.3.2 İnokulasyon sonrası bitkilerde *P. cubensis* yoğunluğunun belirlenmesi

Oxo-C14-HSL molekülünün hıyarda sistemik dayanıklılığını uyarma potansiyeli incelenmiştir. Bu kapsamda hidroponik olarak yetiştirilen bitkilerin besin çözeltilerine final konsantrasyonu 5 μ M olacak şekilde oxo-C14-HSL uygulanmış ve uygulamadan 72 saat sonra *P. cubensis* inokulasyonu yapılmıştır. Patojen inokulasyonundan sonra 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde patojenin yoğunluğu DNA miktarına göre kantitatif olarak belirlenmiştir. İnokulasyondan sonra 24. saatte yapılan ölçümde kontrol grupları ve oxo-C14-HSL grubu arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamıştır. Ancak inokulasyondan sonra 48. saatten itibaren yapılan ölçümlerde AHL uygulanan bitkilerde daha düşük patojen yoğunluğu tespit edilmiştir. Oxo-C14-HSL grubunda kontrole göre 48. saate %34, 72. saate %33,2, 96. saate %19,2 ve 120. saate % 44,5 fungal DNA azalışı gözlenmiştir (Şekil 4.13). Kontrol grubu ile aseton grubu arasında istatistiksel önemli farklılık gözlenmemiştir.

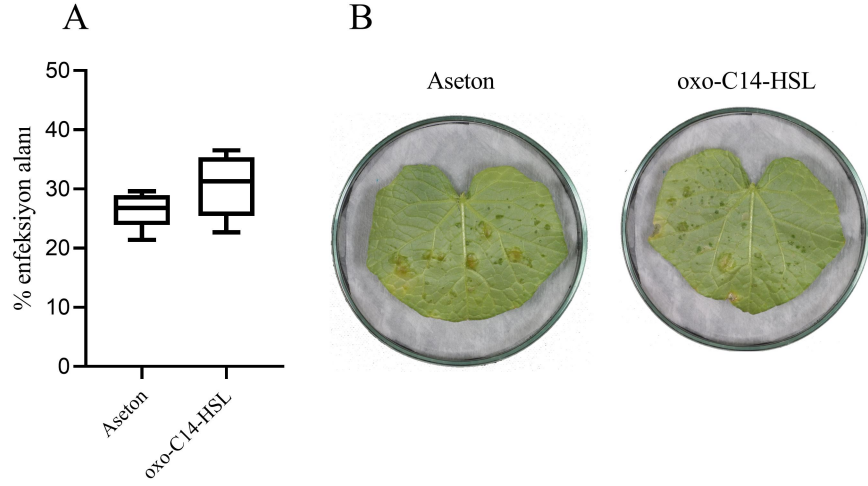


Şekil 4.13 Oxo-C14-HSL ilişkili uyarılmış sistemik dayanıklılığın *P. cubensis* üzerine etkisi A) *P. cubensis*'in oransal DNA miktarı, B) Enfeksiyon noktalarına ve tripan mavisi ile boyanan *P. cubensis*'e ait fotoğraflar, student t testine göre *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$).

4.3.3 Oxo-C14-HSL'nin *P. cubensis* virülensliği üzerine etkisi

Oxo-C14-HSL'nin *P. cubensis*'in virülensliği üzerine etkisi koparılmış yaprak deneyi ile yapılmıştır. Bu amaçla sağlıklı bitkilerden koparılan yapraklar nemli filtre kâğıtları içeren petri kaplarına abaxial yüzleri yukarı bakacak şekilde

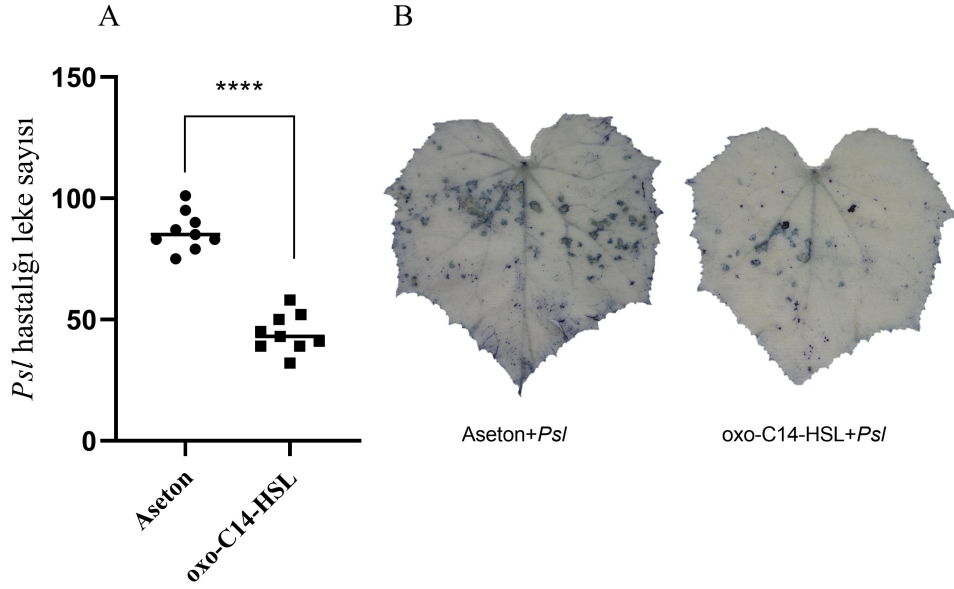
yerleştirilmiştir. Bu yapraklar üzerine 5 μ M konsantrasyonunda oxo-C14-HSL püskürtülmüş ve ardından *P. cubensis* inokulasyonu yapılmıştır. Aseton uygulanan grupta enfeksiyon alanı %26,5 olarak bulunurken, oxo-C14-HSL uygulanan grupta % 30,6 bulunmuştur (Şekil 4.14). İki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.14 Oxo-C14-HSL'nin *P. cubensis* virülensliği üzerine etkisi A) Yüzde enfeksiyon alanı (%) B) Koparılmış yaprak testine ait fotoğraflar.

4.3.4 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'a karşı oxo-C14-HSL ile uyarılmış sistemik etkinin belirlenmesi

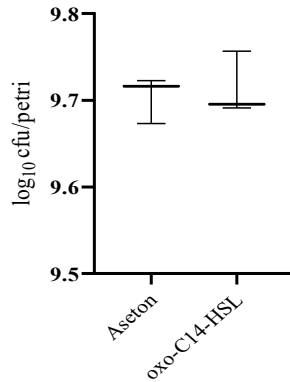
Üç gün boyunca 5 μ M oxo-C14-HSL uygulanmış bitkilere *PsI* inokulasyonu yapılmıştır. İnokulasyondan 7 gün sonra Image J programı aracılığıyla inokulasyon yapılan yapraktaki leke sayısı ölçülmüştür. 5 μ M AHL ile priming yapılan bitkilerde *PsI*'nin neden olduğu leke sayısı kontrol grubuna göre %47,5 daha azdır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Oxo-C14-HSL'nin hastalık şiddeti (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) üzerine etkisinin değerlendirilmesi A) Etmenin neden olduğu enfeksiyon alanının büyüklüğü B) Hastalık şiddetine ait fotoğraflar, Student's *t* testine göre **** ($p < 0,0001$).

4.3.5 Oxo-C14-HSL'nin *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* proliferasyonu üzerine etkisi

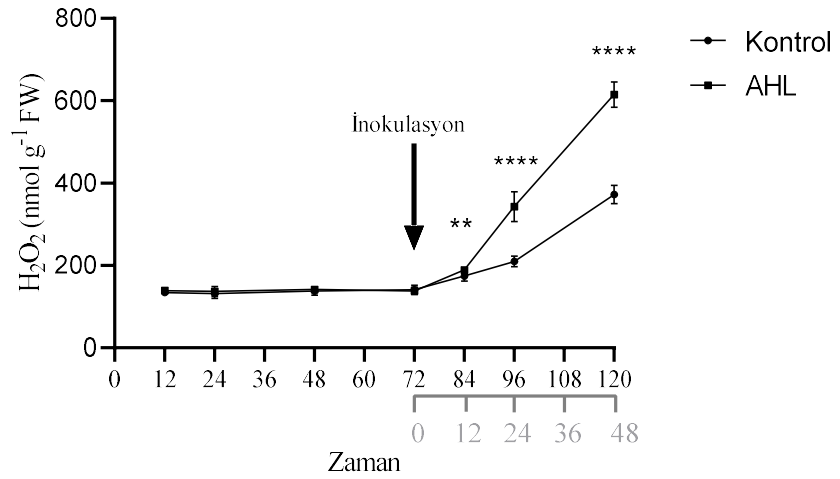
Oxo-C14-HSL'nin *Psl* proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Oxo-C14-HSL'nin *Psl* proliferasyonu üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Aseton uygulanan petrilere görülen koloni sayısı ile oxo-C14-HSL uygulanan petrilereki koloni sayıları birbirine çok yakındır.



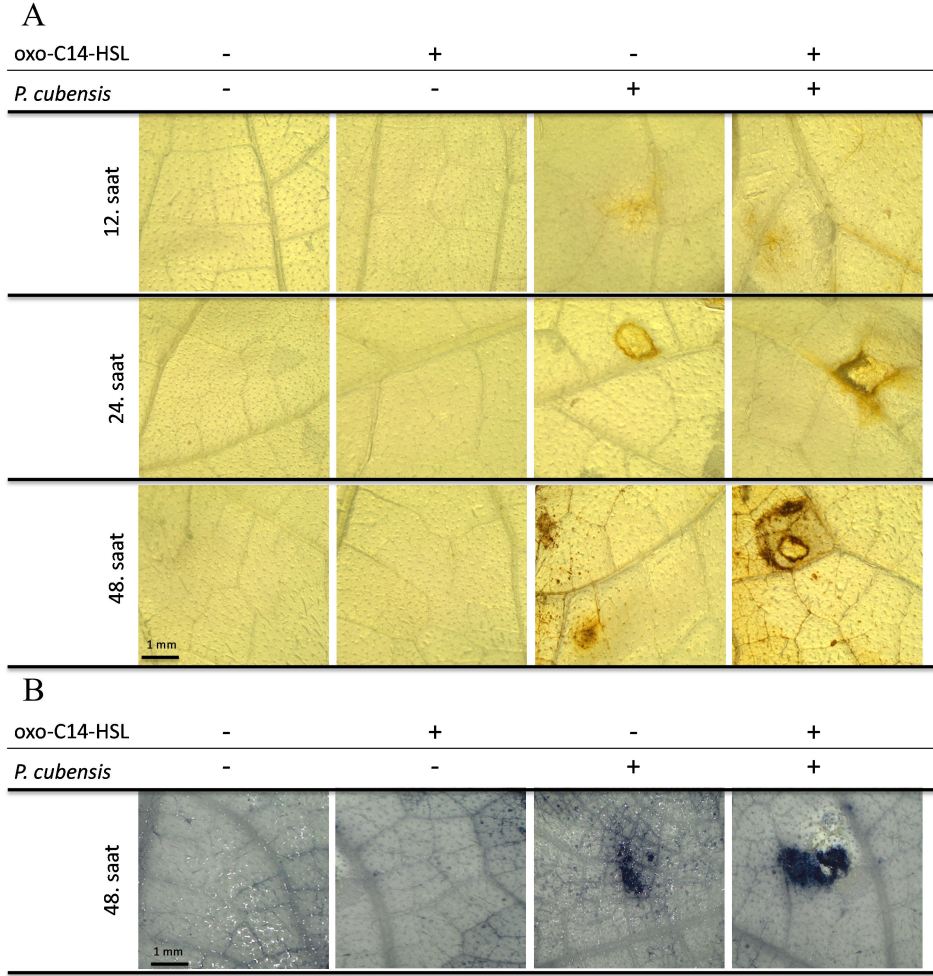
Şekil 4.16 Oxo-C14-HSL'nin *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* proliferasyonu üzerine etkileri

4.3.6 Reaktif oksijen türlerinin histokimyasal olarak boyanması ve kantitatif H_2O_2 miktarının belirlenmesi

5 μM Oxo-C14-HSL'nin H_2O_2 miktarı üzerine etkileri zamana bağlı olarak araştırılmıştır. AHL uygulamasının H_2O_2 üzerine 72 saat boyunca bir etkisi gözlenmemiştir. Uygulamadan 72 saat sonra *P. cubensis* inokulasyonu yapılmıştır. İnokulasyonu takiben 12. saatte AHL uygulanan bitkilerde kontrole oranla %8,4, 24. saatte %64 ve 48. saatte %65 daha fazla H_2O_2 birikimi meydana gelmiştir (Şekil 4.17). H_2O_2 'nin ve $O_2^{\cdot -}$ 'nin histokimyasal olarak belirlenmesi DAB ve NBT boyaması ile yapılmıştır. Boyama sonrası çekilen fotoğralar kantitatif sonuçları doğrulamaktadır (Şekil 4.18). Buna göre kontrol ve AHL uygulamalarının $O_2^{\cdot -}$ üzerine bir etkisi bulunmazken patojen ile indüklenmiş AHL grubunda kontrol grubuna göre daha fazla $O_2^{\cdot -}$ birikimi gerçekleşmiştir.



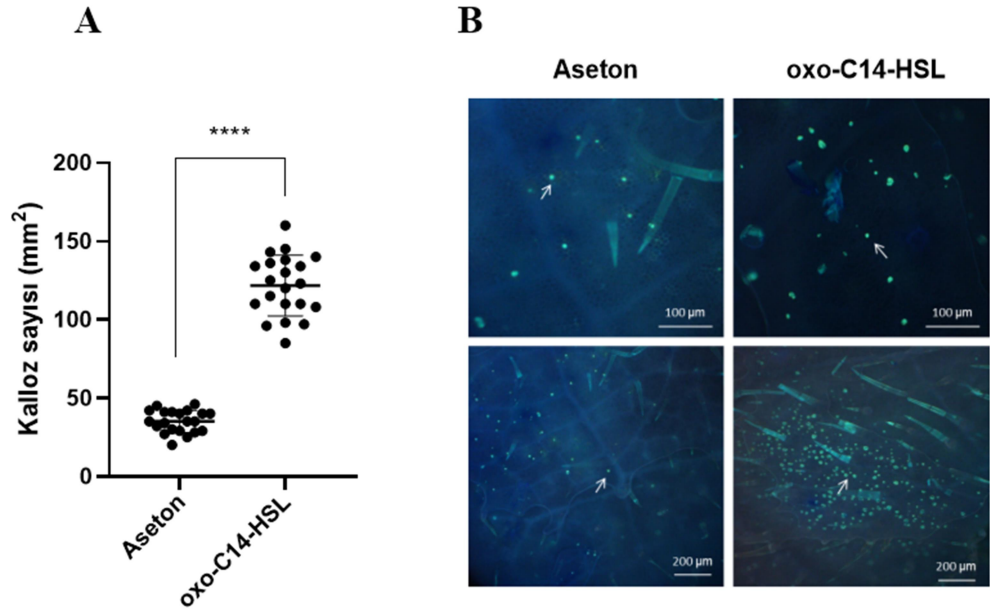
Şekil 4.17 Oxo-C14-HSL uygulamasının H_2O_2 miktarı üzerine etkileri, Student's *t* testine göre ** ($p < 0,01$), **** ($p < 0,0001$).



Şekil 4.18 Reaktif oksijen türlerinin histokimyasal olarak belirlenmesi A) DAB boyama (H_2O_2), B) NBT boyama ($O_2^{\cdot -}$).

4.3.7 İnfekteli dokularda kalloz birikiminin belirlenmesi

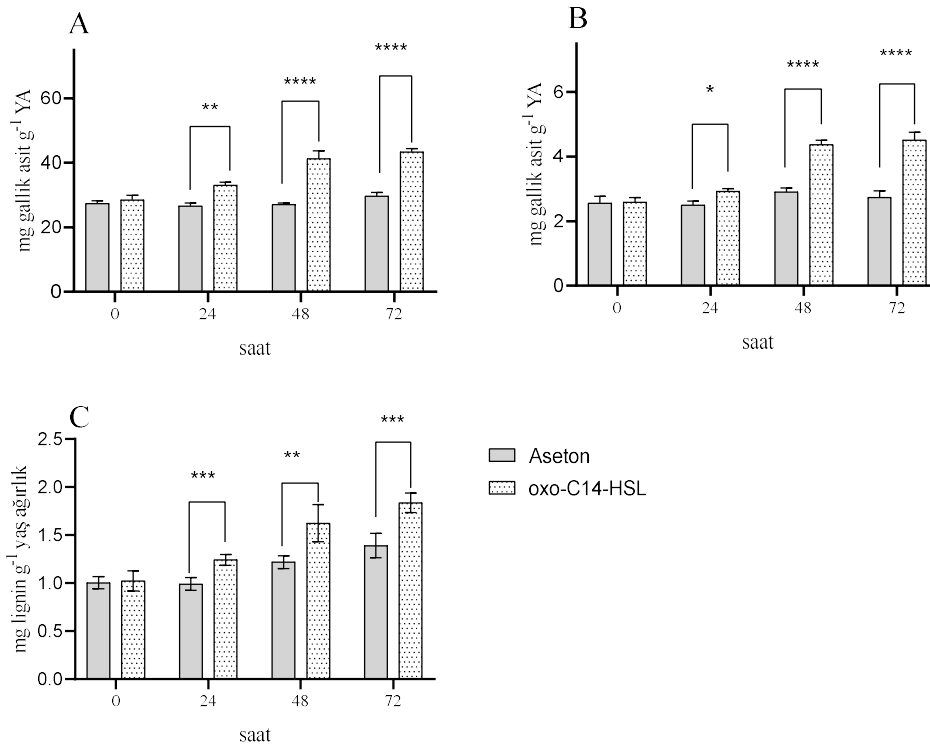
P. cubensis inokulasyonundan 24 saat sonra kalloz birikimi görüntülenmiş ve mm^2 alanda boyanmış kalloz noktalarının sayımları yapılmıştır. Buna göre aseton grubunda ortalama kalloz nokta sayısı 35 iken, oxo-C14-HSL uygulanan grupta bu sayı ortalama 121'dir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Oxo-C14-HSL'nin kaloz birikimi üzerine etkileri, A. Kaloz sayısı B. Enfeksiyon noktalarında kaloz birikimine ait fotoğraflar Student's *t* testine göre *** ($p < 0,001$).

4.3.8 Bitkilerdeki fenolik bileşikler ve lignin içeriğinin belirlenmesi

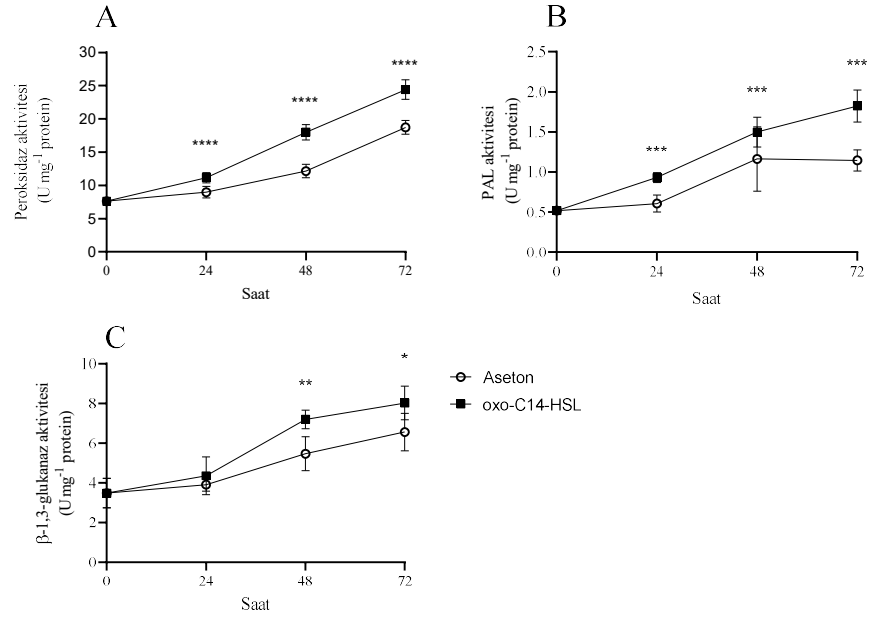
Oxo-C14-HSL'nin hıyar bitkilerinde sekonder metabolitler üzerine etkileri araştırılmıştır. Patojen inokulasyonundan 0, 24, 48 ve 72 saat sonra bitki yaprak fenol ve lignin içeriği ölçülmüştür. Oxo-C14-HSL uygulaması yapılmış yapraklarda patojen uygulamasından sonra çözülebilir fenol içeriği 24. saatte %24, 48. saatte %51,9, 72. saatte ise %46,1 artış göstermiştir (Şekil 4.20A). Hücre duvarında bulunan fenolik bileşikler de bu verilere paralel olarak sırasıyla %16, %48,2 ve %66 artmıştır (Şekil 4.20B). AHL uygulamasının lignin içeriğini de etkilediği saptanmıştır. Kontrol grubunda 24. saatte ortalama 0,9 mg lignin g⁻¹ yaş ağırlık bulunurken oxo-C14-HSL uygulaması yapılan grupta bu değer 1,2'ye yükselmiştir. Benzer şekilde 48. ve 72. saatlerde de hücre duvarlarında bulunan lignin içeriği AHL uygulanan gruplarda istatistiksel olarak önemli artış göstermiştir (Şekil 4.20C).



Şekil 4.20 Oxo-C14-HSL uygulamasının bitki fenol ve lignin içerikleri üzerine etkileri A) Toplam çözünebilir fenolik bileşikler, B) Hücre duvarına bağlı fenolik bileşikler, C) Hücre duvarlarındaki lignin, Student's *t* testine göre * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$), **** ($p<0,0001$).

4.3.9 Peroksidaz (POX), fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve β -1,3-glukanaz (GLU) aktivitesindeki değişimin belirlenmesi

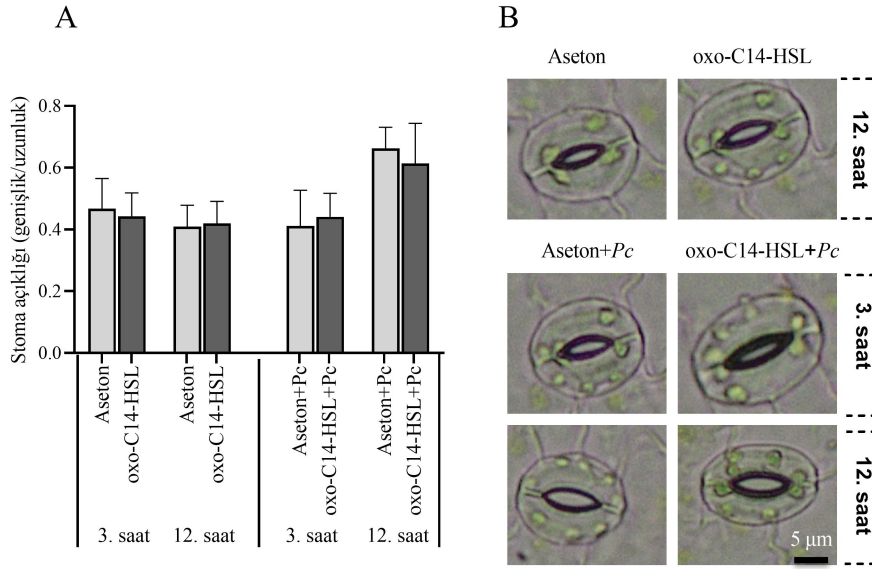
Savunma süreçleri ilişkili enzimler olan POX, PAL ve GLU aktiviteleri inokulasyondan sonra 24. 48. ve 72. saatlerde ölçülmüştür. Patojen inokulasyonundan sonra savunma ilişkili enzimlerin aktivitesinde zamana bağlı olarak artış meydana gelmiştir. Oxo-14-HSL uygulaması yapılan bitkilerde kontrol bitkilerine kıyasla 24. saatten itibaren daha fazla POX ve PAL aktivitesi meydana geldiği gözlenmiştir. AHL uygulanan bitkilerde POX aktivitesi kontrole göre 24. saatte %27,7, 48. saatte %125 ve 72. saatte %30,4, PAL aktivitesi 24. saatte %55, 48. saate %63,5 ve 72. saatte 59,6 daha fazladır. AHL uygulamasının β -1,3 glukanaz aktivitesi üzerinde 24. saatte bir etkisi olmadığı gözlenirken 48. saate %31,6, 72. saatte ise %22,2 artışa neden olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.21 Oxo-C14-HSL uygulamasının bitki savunma enzimleri üzerine etkileri, A) Peroksidaz enzimi, B) Fenilalanin amonyum liyaz enzimi, C) β-1,3-glukanaz enzimi, Student's *t* testine göre * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

4.3.10 Stoma hareketlerinin belirlenmesi

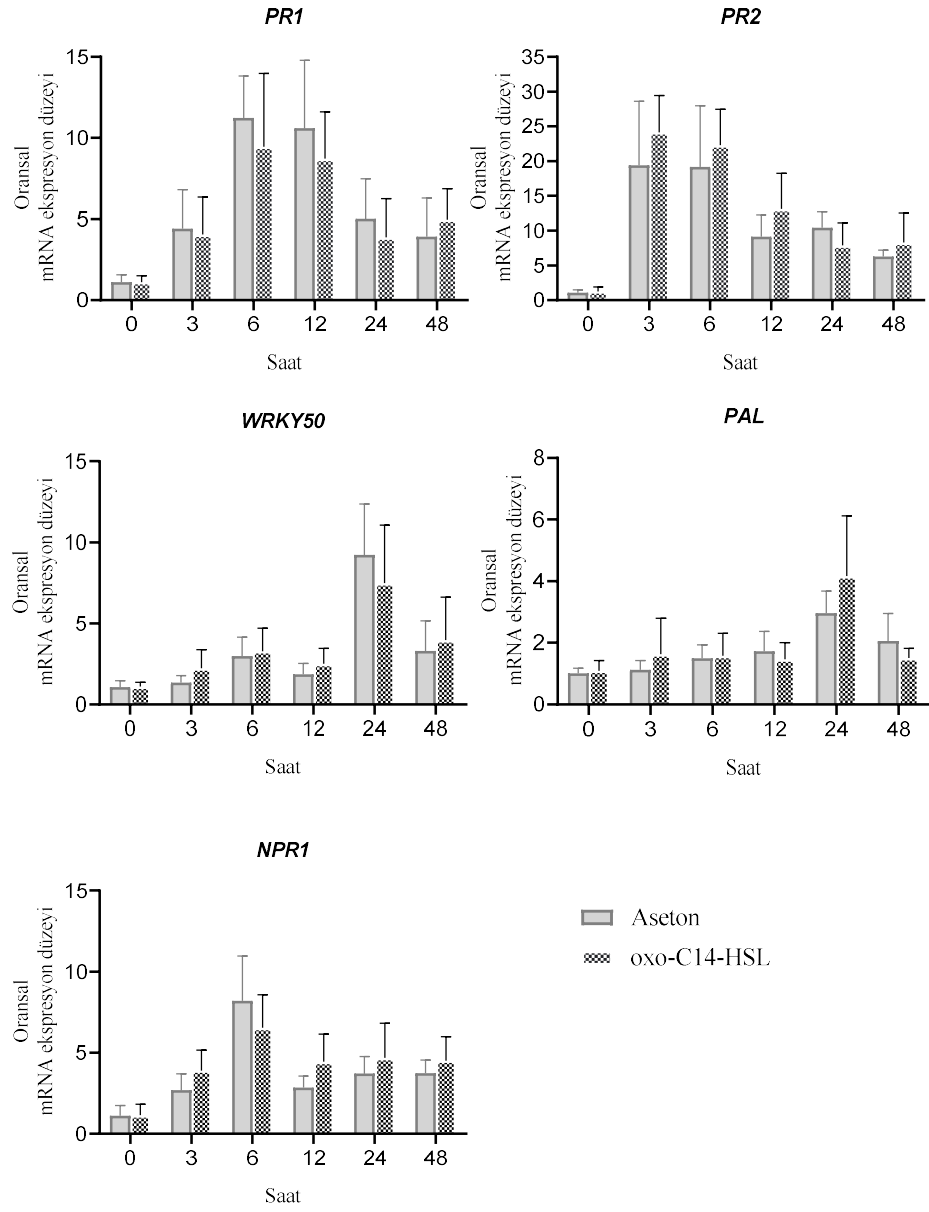
AHL uygulamalarının stoma açıklıkları üzerine etkileri değerlendirilmiştir. AHL uygulamasının 3. ve 12. saatte yapılan ölçümlere göre oxo-C14-HSL'nin stoma açıklığı üzerine bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde *P. cubensis* inokulasyonundan sonra 3. ve 12 saatte oxo-C14-HSL ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur. Ancak inokulasyondan sonra 12. saate her iki gruba ait stoma açıklıkları 3. saattekilere göre artış göstermiştir (Şekil 4.22).



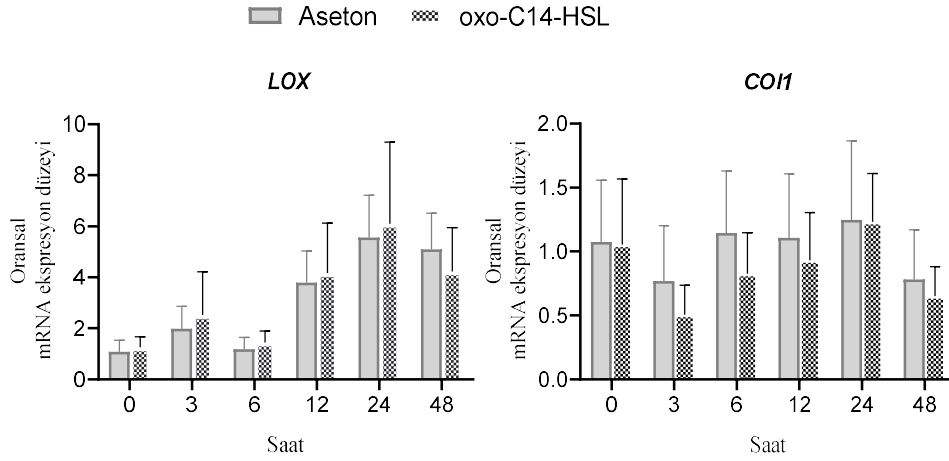
Şekil 4.22 Oxo-C14-HSL uygulamasının stoma hareketleri üzerine etkileri A) Stoma açıklığı değerleri, B. Farklı zamanlarda stomaların açıklıklarına ait fotoğraflar.

4.3.11 Savunma ve sinyalleşme ilişkili genlerin ifadesindeki değişimler

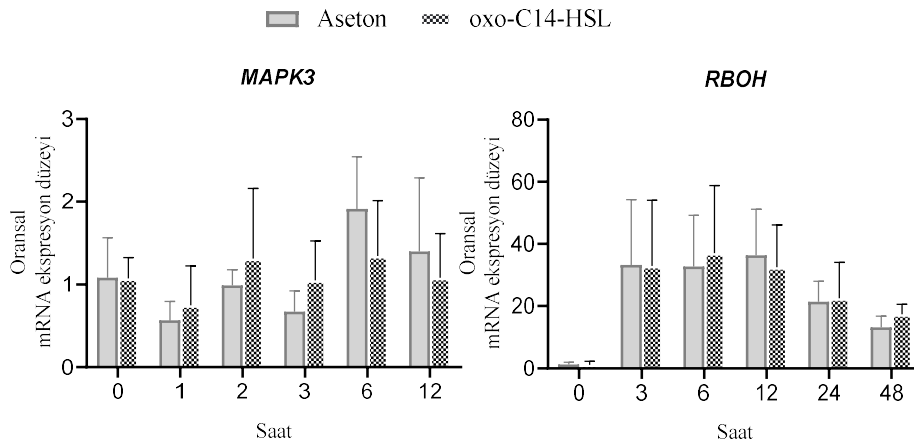
Oxo-C14-HSL, bitki hücre duvarlarını güçlendirerek ve sekonder metabolizmayı aktive ederek *P. cubensis* ve *Psl*'ye karşı sistemik dayanıklılığı uyarmıştır. AHL ilişkili dayanıklılığın moleküler mekanizmalarını ortaya koymak adına savunma ve sinyalleşme ilişkili genlerin ekspresyon profilleri araştırılmıştır. Bu hedef doğrultusunda oxo-C14-HSL uygulamasından 0, 3, 6, 12, 24, 48 saat sonra *MAPK3*, *RBOH*, *WRKY50*, *PR1*, *PR2*, *NPR1*, *PAL*, *ICS2*, *LOX*, *COI1* genlerinin ekspresyonları qPCR ile ölçülmüştür. Ayrıca AHL uygulanmış bitkilerin *P. cubensis* enfeksiyonundan sonra gen ifadeleri de araştırılmıştır. Oxo-C14-HSL uygulamasının hem SA ilişkili (Şekil 4.23) hem de JA ilişkili (Şekil 4.24) genlerin ekspresyon seviyelerinde bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde *MAPK* ve *RBOH* genleri de AHL uygulamasından etkilenmemiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.23 Oxo-C14-HSL uygulanan bitkilere ait salisilik asit ilişkili genlerin (*PR1*, *PR2*, *PAL*, *WRKY50*, *NPR1*) oransal mRNA ekspresyon düzeyleri



Şekil 4.24 Oxo-C14-HSL uygulanan bitkilere ait jasmonik asit ilişkili genlerin (*LOX*, *COI1*) oransal mRNA ekspresyon düzeyleri

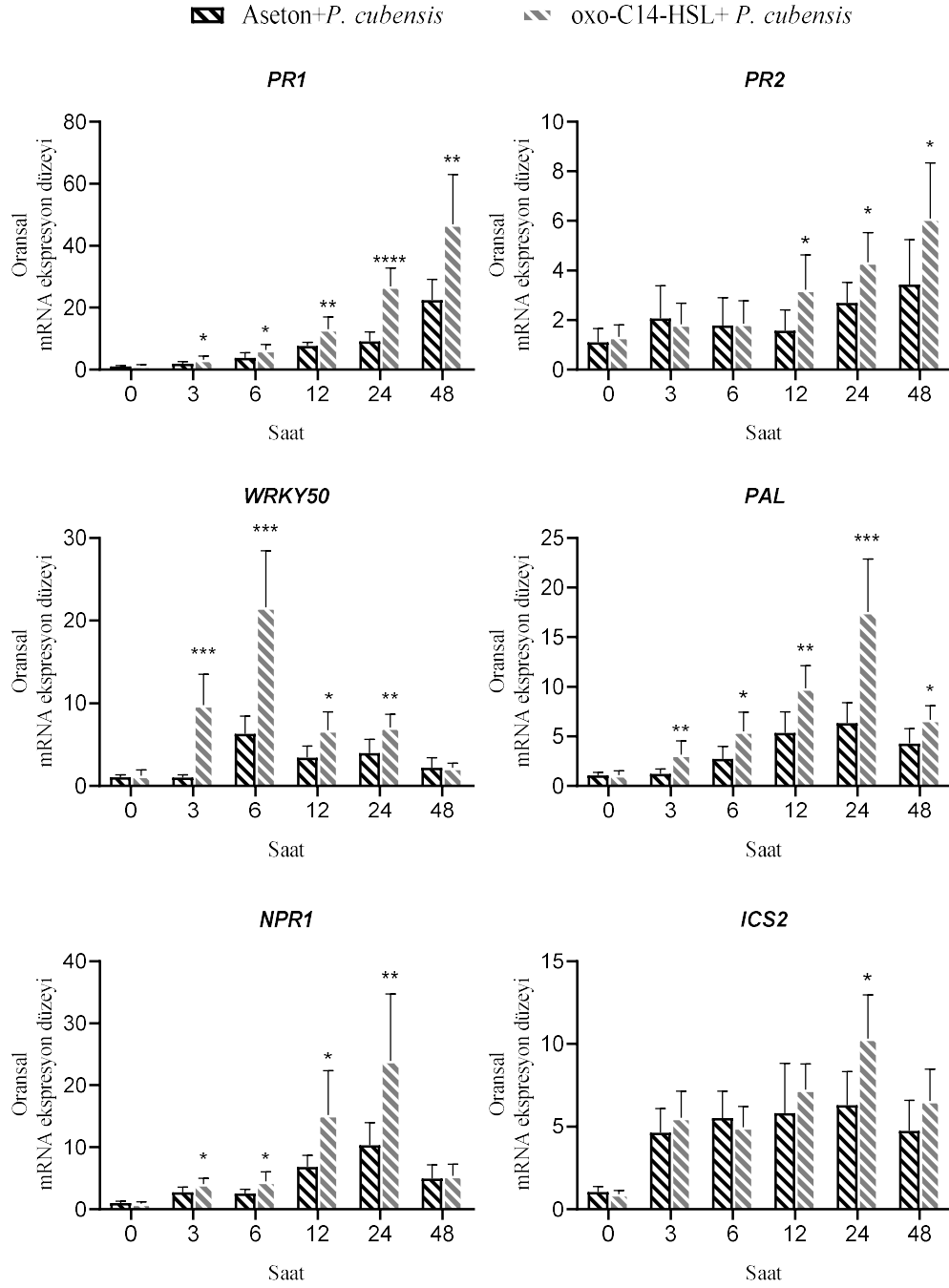


Şekil 4.25 Oxo-C14-HSL uygulanan bitkilere ait *MAPK3* ve *RBOH* genlerinin oransal mRNA ekspresyon düzeyleri

Oxo-C14-HSL beklendiği üzere tek başına ilgili genlerin ifadesinde bir değişime neden olmamıştır. Bunun aksine AHL ile ön uygulama yapılmış bitkilerde *P. cubensis* enfeksiyonundan sonra gen ekspresyon düzeylerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. *PRI*, *PAL*, *NPR1* ekspresyonları inokulasyonu takiben ilk saatlerden itibaren artış göstermiştir ve oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılan gruptaki artış kontrole göre her saatte daha fazla bulunmuştur. Priming yapılmış ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon seviyeleri farkı 48. saate kadar gözlenmiştir (Şekil 4.26). *WRKY50* transkripsiyon faktörünün 3. ve 6. saatlerdeki

aktivitesi oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılan bitkilerde kontrol bitkilerine kıyasla çok güçlü bir artış göstermektedir. Gruplar arasındaki bu fark 24. saate kadar devam etmiştir. Inokulasyonu takiben erken saatlerde *PR2* ekspresyonu bakımından bir değişim gerçekleşmese de 12. saatten itibaren AHL ön uygulaması yapılan bitkilerdeki ekspresyon istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir. *ICS2* geni *PAL* ile birlikte salisilik asit oluşumundan sorumlu iki yolaktan birinde görev alır. Bu genin ifadesi inokulasyondan sonra 3. saatten itibaren artmıştır. Ancak oxo-C14-HSL uygulanan bitkiler ve kontrol bitkileri arasında sadece 24. saatte önemli bir değişim vardır ve 48. saatte bu değişim ortadan kalkmıştır. Bu da AHL ilişkili SA üretiminde *ICS2*'nin *PAL* kadar aktif olmadığına işaret etmektedir (Şekil 4.26).

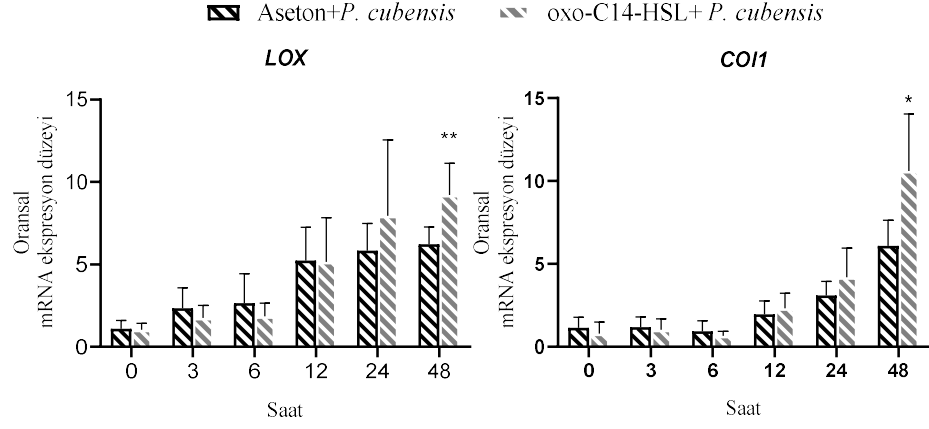




Şekil 4.26 Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılmış bitkilerde *P. cubensis* inokulasyonundan sonra salisilik asit ilişkili genlerin (*PR1*, *PR2*, *PAL*, *WRKY50*, *NPR1*, *ICS2*) oransal mRNA ekspresyon düzeyleri, Student's *t* testine göre * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$), **** ($p<0,0001$).

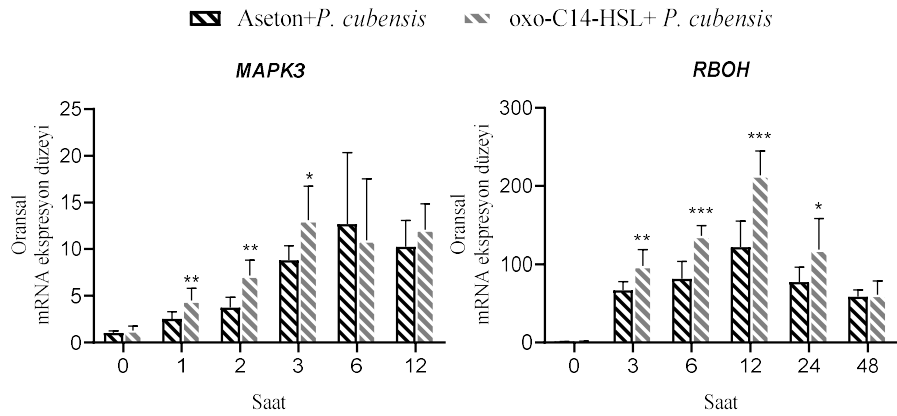
P. cubensis inokulasyonunda sonra 24. saate kadar *LOX* ve *COI1* ekspresyonlarında AHL'nin bir etkisi bulunmamıştır. Ancak 48. saatte oxo-C14-

HSL ön uygulaması yapılmış bitkilerin kontrol gruplarına kıyasla *LOX* ve *COI1* ekspresyonları daha fazladır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılmış bitkilerde *P. cubensis* inokulasyonundan sonra jasmonik asit (*LOX*, *COI1*) ilişkili genlerin oransal mRNA ekspresyon düzeyleri, Student *t* testine göre * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (0,001), **** (p<0,0001).

MAPK3 ve *RBOH* bitki sinyal iletiminde ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunda önemli rollere sahiptir. *MAPK3* ekspresyon seviyesi inokulasyondan hemen sonra artmaya başlamış ve artış 6. saate kadar sürmüştür. AHL ön uygulaması yapılan bitkilerdeki artış kontrole göre istatistiksel olarak daha fazladır. Benzer patern *RBOH* için de gözlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılmış bitkilerde *P. cubensis* inokulasyonundan sonra *MAPK3* ve *RBOH* genlerinin oransal mRNA ekspresyon düzeyleri, Student *t* testine göre * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (0,001), **** (p<0,0001).

5. TARTIŞMA

Uzun yıllar boyunca, bakterilerin koloni içerisindeki ve çevresindeki diğer bakterilerden bağımsız, bireysel organizmalar olarak yaşadığı düşünülüyordu. Son yıllarda yürütülen birbirinden bağımsız birçok çalışma bu düşüncenin artık geçerli olmadığını ve bakterilerin koloninin yararına gen ekspresyonunu koordine etmek için hücreler arası sinyalleri birleştiren sosyal topluluklar olduğunu göstermektedir. Bu tür işbirliğine dayanan yaşam şeklini açıkça yansıtan etkileyici bir olgu quorum algılamadır. QS, bakteriler tarafından gen ekspresyonlarını yoğunluğa bağlı bir şekilde düzenlemek için kullanılan bir mekanizmadır. Bu mekanizma, hücre sayıları ile orantılı olarak artan küçük sinyal moleküllerinin sürekli sentezi ve algısı ile gerçekleşir. Pek çok durumda, bu sinyal molekülleri ileri geri besleme ilmeklerine katılmakta, böylece nispeten küçük bir başlangıç konsantrasyonu transkripsiyonel aktivasyon yoluyla arttırılmaktadır. Bu sinyal moleküllerinin konsantrasyonu belirli bir eşiğe ulaştığında, sinyal iletimi, ilişkili molekülün reseptöre bağlanması yoluyla başlar ve gen ekspresyonunda popülasyon çapında değişiklikler meydana gelir (Bassler, 1999). Bakteriler, metabolik ve gelişimsel mekanizmalardan virülensliğe kadar birçok işlemi düzenlemek için QS sistemlerini kullanırlar ve bir bakteri genomunda kodlanan genlerin %5-25'inin bu sistem tarafından düzenlenebileceği tahmin edilmektedir (Ng and Bassler, 2009; Williams, 2007).

Son zamanlarda, QS alanında yapılan çalışmalar prokaryotik etkileşimlerin ötesine genişlemiştir. Bu araştırmalar, birçok bakteri sinyalinin ökaryotik organizmaların fenotiplerini modüle edebileceğini göstermiş ve bunun sonucunda da belirli QS sinyallerini algılayan, yanıtlayan ve bunlara müdahale eden mekanizmalar ortaya çıkmıştır (Hughes and Sperandio, 2008; Joint et al., 2007; Lowery et al., 2008; Mathesius et al., 2003; Schuëgger et al., 2006). Bu çalışma Gram negatif bakterilerin yaygın olarak ürettiği açıl homoserin laktonların hıyar bitkilerinin büyümesi ve gelişimi ve bitki sağlığı üzerine etkilerini saptamayı amaçlamıştır. Bu çalışma kapsamında ortaya atılan hipotez, ilk olarak Mathesius et al. (2003) ve ilerleyen yıllarda diğer bir çok araştırmacı tarafından, AHL'lere maruz kalan bitkilerin spesifik olarak gen ve protein ekspresyonunu değiştirdiğini, bitkilerin, bitki-patojen etkileşimlerinin sonucunu değiştirebilecek çevre bakterilerden gelen sinyalleri yorumladığını öne süren bulgulardan ortaya çıkmıştır. Örneğin farklı formlarda ve dozlarda AHL moleküllerine maruz kalmış bitkilerin kendilerini patojenlere karşı daha hızlı ve daha etkili savundukları ortaya konmuştur (Schuëgger et al., 2006; Schikora et al., 2011; Schenk et al.,

2014). Benzer şekilde AHL moleküllerinin hem monikotiledon hem de dikotiledon bitkilerde molekül tipine, uygulama dozuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak bitki kök yapısında değişimler meydana getirdiği ve bitki gelişimini teşvik ettiği birçok çalışma ile ispatlanmıştır (Ortiz-Castro et al., 2008; Bai et al., 2012; Palmer et al. 2014; Götz-Rösch et al., 2015; Veliz-Vallejos et al., 2014).

AHL'lerin bitki gelişimini teşvik ettiği ve kök yapılarında modifikasyonlara neden olduğu çeşitli model ve kültür bitkilerinde ortaya konmuştur. Ancak yaptığımız literatür çalışmaları AHL'lerin bitki gelişimi ve kök yapısı üzerine etkilerin genellikle model bitkilerde araştırıldığını göstermektedir. Model sistemlerden elde edilen verilere göre, tarımsal açıdan yüksek potansiyele sahip bu moleküllerin kültür bitkilerde de araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu tez projesinde ilk olarak AHL moleküllerinin hıyar bitkilerinde fitotoksik olarak herhangi bir etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu kapsamda çimlendirilen tohumlar ¼ sertlikte besin çözeltisi içeren hidroponik sisteme aktarılmış ve ~18 gün sonra çözelti içerisine belirtilen konsantrasyonlarda AHL uygulamaları yapılmıştır. Uygulamadan 72 saat sonra yapraklarda MDA içeriği, toplam klorofil miktarı, membran zararlanması ve fotosistem II'deki kuantum verimi ölçülmüştür. Bitki fitotoksitesite değerlendirilmesi açısından önemli olan bu parametrelerin hiçbirinde denenen tüm AHL molekülleri ve dozlarında kontrole göre olumsuz bir değişim saptanmamıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Bu veriler 10 μM 'a kadar farklı karbon zinciri uzunluğuna sahip AHL moleküllerinin hıyar bitkilerinde fitotoksitesiteye neden olmadığını göstermektedir. *Arabidopsis thaliana*'da 17 farklı AHL molekülünün kök uzaması ve fitotoksitesite üzerine etkileri araştırılmıştır (Palmer et al., 2014). 50 μM üzerindeki AHL dozları kök gelişiminde inhibisyona, klorofil miktarında azalışa ve iyon sızıntısında artışa neden olmuştur. Bu parametreler yüksek dozlarda fitotoksik etkinin meydana gelebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada farklı karbon zinciri uzunluğuna sahip 3 AHL tipinin (C6-HSL, oxo-C10-HSL, oxo-C14-HSL) 4 farklı dozda (0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM) bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 10 karbon atomlu açıl zinciri uzunluğuna kadar olan AHL moleküllerinin (C6-HSL ve oxo-C10-HSL) 5 μM ve 10 μM dozlarının bitki gelişimini teşvik ettiği, oxo-C14-HSL gibi uzun karbon zincirli AHL molekülünün ise hıyarda bitki gelişimi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.11). Tüm AHL molekülleri ve dozları uygulamadan sonra 7. günde gövde yaş ve kuru ağırlığında herhangi bir değişime neden olmazken, 14. günde C6-HSL'nin 5 μM ve 10 μM

dozları sırasıyla %13,9 ve %14,7, oxo-C10-HSL'nin 5 μ M ve 10 μ M dozları sırasıyla %26 ve %28,5 yaş ağırlık artışı sağlamıştır. Bu artışlara paralel olarak gövde kuru ağırlıkları da artış göstermiştir. Bu moleküllerin bitki gelişimi üzerindeki olumlu etkisi kök parametreleri ile de benzerlik göstermektedir (Tablo 4.1). AHL moleküllerinin uygun dozlarda bitki gelişimini teşvik ettiği farklı monokotiledon ve dikotiledon bitkilerde belirlenmiştir. C6-HSL'nin 6 μ M dozunun *Arabidopsis* gövde ve kök biyomasını arttırdığı ve oxo-C8-HSL, oxo-C10-HSL, oxo-C12-HSL, oxo-C14-HSL'nin ise herhangi bir etkide bulunmadığı tespit edilmiştir (Schenk et al., 2012, Schikora et al., 2011). Rankl et al. (2016) arpada (*Hordeum vulgare* L.) C8-HSL ve C12-HSL'nin 10 μ M dozunun gövde ve kök biyomasını arttırdığını ve kısa zincirli AHL'nin gelişimi daha etkin bir şekilde teşvik ettiğini belirlemiştir. Bunun aksine farklı bir araştırma grubu aynı doz C6-HSL, C8-HSL ve C10-HSL'nin arpa gelişimi üzerine etkisi olmadığını göstermiştir (Götz-Rösch et al., 2015).

C6-HSL molekülünün denenen üst dozları kök ağırlığında ve uzunluğunda kontrole ve diğer AHL moleküllerine göre artışa neden olmuştur. Kontrol grubunda kök uzunluğu yaklaşık olarak 8,1 cm iken C6-HSL grubunda 9,3 cm'ye ulaşmıştır. Schikora et al. (2011) aynı molekülün *Arabidopsis* primer kök uzunluğunda benzer etkiyi meydana getirdiğini bulmuştur. Von rad et al. (2008), C3 pozisyonunda modifikasyon olmayan farklı tip AHL molekülünün etkilerini değerlendirmiş ve C4-HSL, C6-HSL gibi kısa zincirli moleküllerin *Arabidopsis* köklerinde uzamayı teşvik ettiğini ancak C12-HSL ve C14-HSL gibi uzun zincirli moleküllerinin kök uzamasında herhangi bir değişim meydana getirmediğini göstermiştir. Bununla birlikte C10-HSL uygulamasının kök uzunluğunda belirgin bir azalmaya da neden olduğu belirtilmiştir. Farklı bir araştırmada C4-HSL ve C6-HSL bitki kök büyümesinde herhangi bir etki meydana getirmemiş, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL'nin 12 μ M'ı aşan konsantrasyonları kök büyümesini inhibe etmiştir (Ortíz-Castro et al., 2008). Jin et al. (2012) ve Liu et al. (2012) de 3-O-C6-HSL'nin doğal suş *Arabidopsis*'te primer kök uzamasını teşvik ettiğini göstermiştir. Farklı AHL moleküllerinin *Arabidopsis* kök gelişimindeki etkisini gösteren bu çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıklar AHL uygulama metotlarının, kullanılan konsantrasyonların ve inkubasyon sürelerinin farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda kontrol bitkileri ortalama olarak 9 adet lateral köke sahipken oxo-C10-HSL'nin 5 μ M ve 10 μ M dozlarına maruz kalmış bitkiler 14 adet lateral köke sahiptir. Benzer şekilde kök ucundaki kök tüyü yoğunluğu kontrol

gruplarında ortalama olarak 25 iken oxo-C10-HSL' nin 5 μ M ve 10 μ M gruplarında 95 ile 110 arasında değişen değerlerdedir. Primer kök uzunluğunun artışı teşvik eden C6-HSL'nin lateral kök oluşumu ve kök tüyü yoğunluğu üzerine bir etkisi yoktur. Kök ucundan bir cm uzaklıkta 1 mm alanda yapılan kök tüyü sayımları ve bu tüylerin uzunluklarının ölçümleri AHL uygulamasının bitki kök sistemi üzerine etkisi konusunda daha detaylı bilgiler sağlamıştır. Spesifik olarak oxo-C10-HSL'nin 5 μ M ve 10 μ M dozları sırasıyla %30,9 ve %34 kök tüyü yoğunluğu artışına ve %31,3 ve %26 kök tüyü uzunluğu artışına neden olmuştur (Tablo 4.1). Bu sonuçlara göre hıyar bitkisinin kök sistemi yapısındaki değişikliklerin AHL molekülünün karbon zinciri sayısına bağlı olarak etki ettiği, kısa karbon zincirli olanların kök uzamasını teşvik ettiği, uzun ve orta zincirli olanların doza ve inkübasyona bağlı olarak kökte yapısal değişimlere neden olduğu görülmektedir. Kısa ve orta zincirli AHL moleküllerinin denenen yüksek dozlarında daha güçlü bir dallı kök sisteminin ve daha büyük bir kök yüzeyinin oluşması, bitkilerin daha iyi ve daha yüksek besin alımına yol açabileceğini göstermektedir. Bu durum da AHL uygulanan bitkilerin gövde biyokütlelerinde görülen artışın sebebini açıklayabilir.

Kökler, su ve besin maddelerinin algılanması ve alımı, bitki gövdesinin bağlanması, besin maddelerinin depolanması ve vejetatif üreme için çok önemlidir (Takatsuka and Umeda, 2014). Kök sistemleri embriyonik olarak oluşturulan primer kök ve post embriyonik olarak oluşturulan sekonder kökler olmak üzere iki ana kök tipinden oluşur (Olatunji et al., 2017). Bu ikincil kökler, birincil kökten dallar halinde oluşan hem yan kökleri hem de sürgünlerden, gövdelerden veya yapraklardan geliştirilen saçak kökleri kapsar. Kök sistemi mimarisi, kök uzunluğu, kök açısı ve yanal köklerdeki dallanma ile şekillenir (Bellini et al., 2014; Olatunji et al., 2017). Kök gelişiminin güçlü bir düzenleyicisi olarak oksin, kök sisteminin gelişimini ve mimarisini kontrol etmede önemli rol oynar (Overvoorde et al., 2010). Oksin biyosentezi, polar taşıma ve sinyal iletimi, lateral kök gelişiminin desteklenmesinde anahtar süreçtir (Sun et al., 2017). Diğer bir fitohormon olan sitokinin, lateral kök gelişiminin başka merkezi düzenleyicisidir (Laplaze, 2007; Marhavy et al., 2014). Sitokinin, PIN proteinlerin bozulmasını teşvik ederek ve lateral kök gelişimini yönlendirmek için polar oksin taşınmasına müdahale ederek oksin cevabını antagonize eder (Marhavy et al., 2011; Moreira et al., 2013). Diğer bitki hormonları da doğrudan ya da dolaylı olarak hücre kararlarına katkıda bulunurlar ve yanal kök gelişiminde primer hormonlarla farklı şekilde işbirliği yaparlar. Bai et al. (2012), maş fasulyesinin hipokotil eksplantlarında uzun karbon zincirine sahip AHL moleküllerinin yanal kök

oluşumunu daha fazla teşvik ettiğini ve bu moleküllere maruz kalan bitkilerde daha etkin biyolojik aktivite olduğunu bulmuştur. Ayrıca, özellikle 3-O-C10-HL gibi dallanmış zincirlerinin C3 konumunda açillenmiş bir gruba sahip AHL'ler, en belirgin aktiviteyi göstermiştir. 3-O-C10-HL, H₂O₂, NO ve cGMP oluşumunu uyarmak, polar oksin taşınmasını hızlandırmak ve yanıl kök oluşumunu uyarmak için analoğu olan C10-HL'den daha iyi bir kapasiteye sahip olduğu ortaya konmuştur. 3-O-C8-HL ve 3-O-C12-HL benzer etkiler gösterse de, analogları olan C8-HL ve C12-HL'lerin aksine, etkileri 3-O-C10-HL'ninkinden daha düşüktür. Bu veriler, sadece AHL'lerin dallanmış zincir uzunluğunun değil aynı zamanda farklı boyutsal yapılar oluşturan dallanmış zincirlerindeki alt grupların biyolojik etkinliklerinin tanımlanmasında rol oynayabileceğini göstermektedir. Ortíz-Castro et al. (2008) ayrıca C10-HL'nin *Arabidopsis* kök sistemi mimarisini değiştirmede daha etkili olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde AHL ile yapısal ve fonksiyonel benzerlik gösteren NAE ve alkamidler de AHL'ler gibi yapıya bağlı biyolojik aktivite göstermektedir.

Önceki çalışmalar, *Arabidopsis* primer ve lateral kök oluşumunun bazı AHL'ler veya alkamidler tarafından modüle edilmesinin, oksin sinyalleşmesinden bağımsız olduğunu göstermektedir (Ortíz-Castro et al., 2008; Méndez-Bravo et al., 2010; Morquecho-Contreras et al., 2010). Örneğin oksin varlığında cevap oluşturan DR5:uidA geni taşıyan transgenik *Arabidopsis* bitkileri C10-HL uygulaması sonucu GUS aktivitesini arttıramamıştır (Ortíz-Castro et al., 2008). Ancak Mathesius et al. (2003), 3-O-C12-HL ve 3-O-C16-HL gibi dallanmış karbon zincirinde açıl sübstütüsyonu olan AHL'lerin, model baklagil olan *Medicago truncatula*'da dokuya spesifik olarak oksine cevap oluşturan GH3 ve kalkon sentaz genlerinin aktivasyonunu arttırdığını bildirmiştir. Bu bulgular, AHL'lere cevap olarak oksin sinyalleşmesinde değişkenlik olduğunu göstermektedir. Bai et al. (2012) maş fasulyesinde çeşitli AHL'lerin polar oksin taşınmasını aktive etme yeteneklerini ölçmüştür ve 3-O-C10-HL, 3-O-C8-HL, 3-O-C12-HL gibi C3 pozisyonunda açıl dallanmış zinciri olan AHL'lerin etkin bir şekilde polar oksin taşınımını uyardığını göstermiştir. C10-HL ve C12-HL gibi C3 pozisyonunda açıl modifiye dallanmış zinciri olmayan AHL'ler ise polar oksin taşınımını çok az etkilemiştir. Ayrıca C10-HL'nin oksin ilişkili *Aux22c*, *Aux22d*, *Aux22e* gibi genlerin transkripsiyonunu arttırdığı görülmüştür. Bu sonuçlar AHL ailesindeki dallanmış zincirlerin yapısının oksin taşınımını etkilediği gözlemine daha fazla destek sağlamaktadır. Ayrıca bu veriler neden 3-O-C10-HL'nin *Medicago truncatula*'da oksin ilişkili gen ekspresyonunu aktive ettiğini (Mathesius et al., 2003) ve neden C10-HL'nin *Arabidopsis*'te oksinden bağımsız

lateral kök gelişimini teşvik ettiğini açıklamaktadır (Ortiz-Castro et al., 2008, von Rad et al., 2008; Shi et al., 2010).

Oksin hormonu hıyarda (*Cucumis sativus* L.), domateste (*Lycopersicon esculentum* L.) ve *Arabidopsis thaliana*'da (Joo et al., 2005; Pagnussat et al., 2003; Chen et al., 2010) H_2O_2 ve NO oluşumunu tetiklemiş ancak tütünde (*Nicotiana tabacum* L.) NO oluşumu üzerinde bir etki göstermemiştir (Tun et al., 2001). Bu durum oksin ilişkili ROS ve RNS üretiminde evrensel bir mekanizma olmadığını, türlere ve koşullara bağlı olarak yolların değişebileceğini işaret etmektedir. 3-O-C10-HSL uygulamasının maş fasulyesi köklerinde hızlı bir H_2O_2 ve NO üretimine neden olmuştur ve bu sonuçlar H_2O_2 tutucusu olan BHT (butylated hydroxytoluene) ve NO tutucusu olan cPTIO (karboksi PTIO potasyum tuzu) kullanılarak da doğrulanmıştır (Bai et al., 2012). Plasma membranı ilişkili NADPH oksidaz inhibitörü olan DPI (Diphenyleneiodonium) varlığında 3-O-C10-HL ilişkili H_2O_2 üretimi belirgin bir şekilde baskılanmıştır ve bu durum AHL kaynaklı H_2O_2 üretiminde NADPH oksidazların rol oynayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, DPI'nın aynı zamanda bir flavin analogu olduğu ve bu nedenle burada görülen H_2O_2 oluşumundan diğer flavin-içeren enzimlerin de sorumlu olabileceği gözden kaçırılmamalıdır. NPA ya da IAA inhibitörleri ile polar oksin taşınımının engellenmesi 3-O-C10-HL ile uyarılmış H_2O_2 ve NO oluşumunu azaltmıştır. Diğer yandan C10-HL gibi modifiye edilmiş dallanmış zincire sahip olmayan AHL'ler polar oksin taşınımını ve H_2O_2 ile NO üretimini sadece çok az bir miktar arttırmıştır. Bu sonuçlar 3-O-C10-HL aracılığı ile arttırılmış polar oksin taşınımının H_2O_2 veya NO oluşumuna muhtemelen katkıda bulunduğunu göstermektedir. AHL homoloğu olarak hareket eden bir lipid sinyali olarak bitki alkamitleri, *Arabidopsis*'te NO birikimini ve yanal kök oluşumunu indüklemiştir (Campos-Cuevas et al., 2008). Bu durum bitkilerin dışarıdan verilen AHL'lere ve endojen olarak üretilen alkamidlere ve uyarımlarına yanıt oluşturmak için benzer mekanizmaları geliştirmiş olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız kapsamında hıyar bitkilerinde C6-HSL ilişkili kök uzaması ve oxo-C10-HSL ilişkili lateral kök sayısı ve kök tüyü yoğunluğunun artması cevaplarının olası mekanizmaları irdelenmemiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde AHL'lere karşı kök mimarisinde verilen cevapların oksin ya da sitokinin gibi hormonlarla düzenlendiği ve reaktif oksijen türlerinin ve nitroz oksitlerinde sinyalleşmede rol alabileceğini göstermektedir. Ancak etilen ve jasmonik asit gibi bazı diğer fitohormonların da AHL'ye verilen cevaplar içinde olduğu ve bu hormonların AHL ilişkili bitki büyümesi ve gelişimindeki değişimlerinde rolü olabileceği unutulmamalıdır. Bununla birlikte hıyarda

fosfatidik asit ve karbon monoksit gibi mesajcı moleküllerin yanal kök oluşumundaki etkileri çalışılmıştır (Lanteri et al., 2008; Xuan et al., 2008). Ancak bu sinyal moleküllerinin AHL ilişkili kök yapısı değişimlerindeki rolü hakkında bir çalışma bulunmamaktadır. O nedenle AHL'nin teşvik ettiği kök uzaması ve yanal kök oluşumunda yaygın bilinen fitohormonlar ve sinyal moleküllerinin yanında fosfatidik asit ve karbon monoksit gibi moleküllerin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın ikinci aşamasında AHL moleküllerinin bitki patojen interaksiyonlarını etkilediği ortaya konmuştur. Bugüne kadar AHL molekülleri 70'den fazla gram negatif bakteride belirlenmiştir (Chang, 2014). AHL ilişkili QS, çeşitli bakteri iletişim biçimleri içerisinde en fazla aydınlatılmış olandır (Whitehead et al., 2001; Zhang and Dong, 2004; Waters and Bassler, 2005; Dong et al., 2007). Birçok araştırmacı tarafından da ortaya konduğu gibi bitkiler (Mathesius et al., 2003; Ortíz-Castro et al., 2008; von Rad et al., 2008) ve hayvansal organizmalar gibi (Teplitski et al., 2011; Karlsson et al., 2012) ökaryotik canlılar AHL'leri algılamakta ve onlara karşı reaksiyon geliştirmektedir. Schikora et al., (2011), Hernández-Reyes et al. (2014) ve Schenk et al. (2014)'un yürüttüğü sistemik çalışmalar AHL ilişkili savunma reaksiyonlarının temelleri konusunda birçok aydınlatıcı veri sağlamıştır. Bu çalışmalar kapsamında uzun karbon zincirli AHL molekülü olan oxo-C14-HSL'nin hemibiyotrof bakterilere ve biyotrof funguslara karşı priming molekülü olarak kullanılabileceği ve bu hastalıkların baskılanmasında yüksek etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. AHL ilişkili sinyalleşme ve savunma reaksiyonlarının mekanizmaları daha çok model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da gösterilmiştir. Priming molekülleri olarak AHL'lerin özellikle ticari değeri olan kültür bitkilerindeki savunma reaksiyonları üzerine olan direkt etkileri konusundaki çalışmalar çok kısıtlıdır. Bu araştırma kapsamında farklı lipit zinciri uzunluğuna sahip AHL'lerin hıyarda biyotrof bir patojen olan *P. cubensis*'e karşı sistemik bitki savunma sistemini nasıl etkilediği ve etkinin fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları araştırılmıştır.

AHL moleküllerinin biyolojik aktivitesi sahip oldukları lipid zincirinin uzunluğuna bağlıdır. Daha önceden de detaylı olarak bildirildiği ve bizim sonuçlarımızda da ortaya konduğu gibi 4-10 karbona sahip AHL'ler bitki gelişimini teşvik etmekte (Gao et al., 2003; von Rad et al., 2008; Liu et al., 2012), 12-14 karbon uzunluğuna sahip AHL'ler ise *Arabidopsis thaliana*'da, *Solanum lycopersicum*'da, *Hordeum vulgare*'de, *Medicago truncatula*'da sistemik bitki

dayanıklılığını uyarmaktadır (Mathesius et al., 2003; Schikora et al., 2011; Zarkani et al., 2013; Schenk et al., 2014). Bu araştırma kapsamında C6-HSL, oxo-C10-HSL ve oxo-C14-HSL'nin 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M dozlarının hıyar bitkilerinde *P. cubensis*'e karşı sistemik dayanıklılığı uyarma potansiyeli incelenmiş ve kısa zincirli moleküllerin (C6-HSL, oxo-C10-HSL) bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Ancak uzun zincirli AHL (oxo-C14-HSL), *P. cubensis* ve *P. syringae* pv. *lachrymans*'a karşı savunma sistemini harekete geçirmiş ve sistemik bir dayanıklılığı uyarmıştır (Şekil 4.12, Şekil 4.15). oxo-C14-HSL'nin 0,1 μ M konsantrasyonu herhangi bir koruma sağlamazken 1 μ M ve üzerinde *P. cubensis*'e karşı geliştirilen savunmada artışlar gözlenmiştir. En başarılı doz 5 μ M olarak kaydedilmiştir. Oxo-C14-HSL'nin 6 μ M dozunun arpada'da *Blumeria graminis* f. sp. *hordie*'ye (Hernández-Reyes et al., 2014) ve *Arabidopsis*'te *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ve *Golovinomyces orontii*'ye (Schikora et al., 2011) karşı etkili olduğu bildirilmiştir ve bu sonuçlar bizim verilerimiz ile paralellik göstermektedir.

AHL ilişkili *P. cubensis* enfeksiyonunun azalışı fenotipik görüntüleme ve gen ekspresyonu çalışmaları ile kantitatif olarak da ortaya konmuştur. 48. saatten itibaren oxo-C14-HSL ile priming yapılan bitkilerde daha küçük enfeksiyon alanları ve daha az *P. cubensis* DNA'sı bulunmuştur. Özellikle inokulasyondan sonra 120. saatte yapılan ölçümlerde kontrol ve AHL grupları arasındaki fark diğer saatlere göre çok daha fazladır. Tripan mavisi ile enfeksiyon noktalarında yapılan patojen görüntülemesi bu saate kontrol gruplarında eşeysiz üremenin başladığını ancak oxo-C14-HSL grubunda henüz sporulasyonun başlamadığını göstermiştir. Kontrol bitkilerinde eşeysiz üremeye çok sayıda sporangium oluşumu, 120. saatteki belirgin *P. cubensis* DNA artışının sebebini açıklamaktadır.

Sinorhizobium meliloti, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Rhodobacter spheroides*, *Burkholderia pseudomallei* ve *Yersinia enterocolitica* gibi birçok bakteri türü 14 karbonlu AHL molekülleri üretmektedir (Williams, 2007). Charlton et al. (2000) bitkilerle faydalı ancak insanlarla patojenik ilişki kuran *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilmi içerisinde oxo-C14-HSL'nin 40 μ M dozuna ulaşabildiğini ve uygun şartlarda daha yüksek konsantrasyonlarında oluşabileceğini bildirmiştir. Bitkilerin AHL moleküllerine oluşturdukları savunma reaksiyonları da sadece lipit zinciri uzunluğuna bağlı değildir. Yağ asidi zincirindeki γ pozisyonunda olan modifikasyonlar da verilen reaksiyonları değiştirebilir. Schikora et al. (2011) bu pozisyonda OH ya da O grubunun

olmasının Pst' ye kaşrı oluşturulan savunma tepkisini etkilediğini bildirmiştir. Arabidopsis'te Pst enfeksiyonu oxo-C14-HSL uygulanan bitkilerde OH-C14-HSL uygulanan bitkilere göre daha düşük bulunmuştur. Araştırmamız kapsamında sadece zincir üzerinde O bulunan (oxo) AHL molekülleri kullanılmıştır. Ancak aynı karbon sayısına sahip OH içeren başka bir AHL kullanılması durumunda etkinin değişkenlik gösterebileceği düşünülmektedir.

Bugüne kadar homoserin laktonları parçalayan iki farklı enzim olduğu keşfedilmiştir. AHL laktonazlar lakton halkasını açarlar ve molekülü hidrolize ederken (Dong et al., 2001), AHL aılazlar lakton halkasını açıl zincirinden ayırırlar (Dong and Zhang, 2005). AHL laktonazlar kırmızı bir alg türü olan *Delisea pulchra*'da bulunmuştur ve bu enzimlerin alg yüzeyinde biyofilm oluşumunu engellediği gözlenmiştir (Rasmussen et al., 2000). Bakteriyel oto-uyarıcıların bitkilerin içine alınması alemlerarası (bakteri-bitki) iletişimin ilk basamağını oluşturmaktadır. Çeşitli alışmalar AHL'lerin Arabidopsis'te (von Rad et al., 2008, Schikora et al., 2011) ve arpada (Götz et al., 2007) kök içine alındığını göstermiştir. C6-HSL ve C8-HSL gibi kısa zincirli AHL'ler gövdeye taşınabilmekte (Götz et al., 2007), ancak oxo-C14-HSL gibi uzun zincirli olanlar taşınamamaktadır (Schikora et al., 2011, Sieper et al., 2014). Bu durumda taşınımın açıl zincir uzunluğu ile ters orantılı olduğu söylemek mümkündür. Litertrde gösterildiği gibi uzun zincirli AHL'lerin bitkinin üst aksamlarına taşınamaması, *P. cubensis*'e karşı meydana gelen dayanıklılık reaksiyonunun sistemik etkiden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Oxo-C14-HSL' nin *P. cubensis*' in virülensliği ve Psl' nin proliferasyonu üzerine doğrudan etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu kapsamda koparılmış hıyar yaprakları nemli filtre kâğıtları içeren petrilere konulmuş ve zerine 5 μ M oxo-C14-HSL pskrtlmştir. AHL uygulamasından hemen sonra 1×10^5 sporangium/ml konsantrasyonunda *P. cubensis* inokulasyonu yapılmıştır. İnokulasyondan sonra 8. günde yapılan ölçümlerde kontrol ve oxo-C14-HSL uygulanan bitkiler arasında hastalık şiddetinin (virlensliğin) istatistiksek olarak farklı olmadığı grlmştir. Oxo-C14-HSL'nin Psl'nin poliiferasyonu üzerindeki direkt etkisi ise invitro da araştırılmıştır. Final konsantrasyonda 5 μ M oxo-C14-HSL içeren King B ortamlarına Psl inokule edilmiş ve 48 saat sonra koloni sayımı yapılmıştır. Oxo-C14-HSL'nin bakteri proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar AHL ilişkili mildiyö enfeksiyonunun azalışında oxo-C14-HSL'nin direkt etkisinin olmadığını, hastalık azalışının sistemik sinyal iletiminden kaynaklandığını kanıtlamaktadır. Schikora et al. (2011) de bizim

bulgularımıza paralel olarak 6 μ M oxo-C14-HSL'nin *Pst* proliferasyonunu ve virülensliğini etkilemediğini bildirmiştir.

Bitkiler mikroorganizmaların saldırılarını bertaraf etmek için iki ayrı ve aynı zamanda ilişkili savunma basamağına sahiptirler (Boller and Felix, 2009). Bunlardan ilki patojen ilişkili moleküler yapılar ya da hasar ilişkili moleküler yapılar (PAMPs, DAMPs) olarak da adlandırılan evrimsel olarak korunmuş elisitörler olan patern tanıma reseptörlerini (PRRs) algılamaya dayanır ve bu algılama sonucu PAMP ilişkili tetiklenmiş savunma (PTI) reaksiyonları ortaya çıkar (Jones and Dangl, 2006). Ancak yüksek virülenslik gösteren başarılı patojenler PTI'ye müdahale eden ya da baskılayan efektör molekülleri salarak efektör ilişkili duyarlılığa (ETS) neden olurlar (Jones and Dangl, 2006). Savunmanın ikinci basamağı ise hücre içi immün reseptörler ile patojen efektörlerinin direkt ya da indirekt olarak tanınması sonrası ortaya çıkan efektör ilişkili savunmadır (ETI) (Jones and Dangl, 2006). ETI çok spesifiktir ve genel olarak HR reaksiyonu ile enfeksiyon noktalarında hücre ölümü ile sonuçlanır. Hem PTI hem de ETI patojen ile bitki temasının ilk dakikalarından itibaren birçok sinyal mekanizmasını aktive eder (Tsuda and Katagiri, 2010). İyon sızıntıları ve sitozolik kalsiyum seviyelerindeki değişiklikler elisitörlerin tanınmasından çok kısa bir süre sonra meydana gelen erken cevaplardır (Garcia-Brugger et al., 2006; Jeworutzki et al., 2010). Bu iyon değişimleri plasma membranının depolarizasyonuna neden olur ve hücre ölümü başlatılır. Genel olarak plasma membranındaki NADPH oksidazlar tarafından üretilen reaktif oksijen türevlerinin oluşumu (Simon-Plas et al., 2002) ve bununla birlikte MAPK kaskadların aktivasyonu (Torres et al., 2002) tamamlayıcı hücre dışı ve hücre içi sinyalleşmede önemli olaylardır ve bütünsel transkriptomun yeniden programlanmasına yol açarlar (Besson-Bard et al., 2008; Pitzschke et al., 2009). Salisilatlar, jasmonatlar, etilen ve absisik asit gibi bitki hormonları savunma cevaplarının hassas bir şekilde ayarlanmasında rol alır (Koornneef and Pieterse, 2008; López et al., 2008). Başta *Arabidopsis* olmak üzere birçok türde biyotrof patojenlere karşı savunmada SA ilişkili sinyal yolağının, nekrotrof patojenlere karşı ise JA/ET ilişkili sinyal yolağının çalıştığı gösterilmiştir (Glazebrook, 2005). Bu durum bir konsensustur ve istisnaları literatürde mevcuttur (Ferrari et al., 2007). Bu sinyal yollarının yalnız ya da birlikte çalışması sonucu patojenler üzerinde direkt etkiye sahip fitoaleksinler (Hammerschmidt, 1999) gibi antimikrobiyal sekonder metabolitler ve β -1,3-glukanazlar, peroksidazlar ve kitinazlar gibi PR proteinleri (van Loon et al., 1998) oluşmaktadır. Ayrıca papilla oluşumu, hücre duvarlarının lignifikasyonu (Yang et al., 2018) ve fenolik

içeriklerinin arttırılması (Bhattacharya et al., 2010), kalloz birikimi (Luna et al., 2011) gibi oluşumlar bitkilerin patojenlere karşı oluşturduğu yapısal değişimlerdir. Birbirinden fenotipik olarak ayrılması oldukça güç olan 2 tip uyarılabilir sistemik dayanıklılık tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki patojenik olmayan bakteriler tarafından tetiklenen uyarılmış sistemik dayanıklılıktır (ISR) (van Loon et al., 1998). Diğeri ise bitkinin lokal olarak patojenle karşılaşması sonucu bütün bitkide ortaya çıkan sistemik kazanılmış dayanıklılıktır (SAR).

Reaktif oksijen türleri (ROS) çeşitli patojenlere karşı bitki savunmasında merkezi bir role sahiptir (Mittler et al., 2004). Süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit en önemli ROS formlarıdır. Bu moleküllerin yüksek konsantrasyonları oldukça toksiktir ve hücrelerin oksidatif olarak yıkımına yol açabilir (Asada, 2006). ROS'ların enfeksiyon noktalarında hızlı birikimi oksidatif patlama olarak adlandırılan bir olgudur ve bu noktalarda artan H_2O_2 patojenlere direkt olarak toksik etki yapar (Lamb and Dixon, 1997). Bitki dokularında artan ROS'un, biyotrof patojenlerin yayılmasını önleyen konukçu hücre ölümüne (hipersensitif reaksiyon) neden olduğu da bilinmektedir (Heath, 2000; Gechev et al., 2006). Ayrıca ROS'lar diğer savunma mekanizmalarının aktivasyonunu sağlayan çok önemli sinyal molekülleridir (Dat et al., 2000; Grant and Loake, 2000). Hıyarda oxo-C14-HSL ilişkili savunma reaksiyonlarının mekanizmalarını daha detaylı çalışmak üzere 3 gün boyunca AHL ile priming yapılan ve yapılmayan bitkilere *P. cubensis* inokulasyonu yapılmıştır. İlk olarak enfeksiyon noktalarında H_2O_2 ve O_2^- oluşumu histokimyasal olarak ve H_2O_2 birikimi kantitatif olarak belirlenmiştir. H_2O_2 seviyesi AHL uygulanan ve kontrol bitkilerinde 72 saat boyunca aynı basal seviyede seyretmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Bu durum oxo-C14-HSL'nin tek başına bir elisitör olmadığını göstermektedir. *P. cubensis* inokulasyonundan sonra 12. saatte kontrol grubunda H_2O_2 birikiminde önemli artış meydana gelmemesi bitkilerin bu aşamada etkili bir cevap oluşturmadığına işaret etmektedir. Ancak aynı saatte inokulasyon yapılmış AHL gruplarında meydana gelen artış oxo-C14-HSL'nin savunma reaksiyonları için bitkiyi hazırlamış olduğunu göstermektedir. İnokulasyondan sonra 24. saatte kontrol gruplarında da H_2O_2 seviyesinde artış meydana gelmiştir. Bu durum H_2O_2 ilişkili savunma başlangıcının 12 saatten sonra ancak 24 saatten önce başladığını işaret etmektedir. Bitki hücrelerinde hızlı H_2O_2 birikimi ve kalloz birikimi gibi hücresel savunma yanıtlarının hızlı üretimi ISR tetikleyici bakterilerin indüklediği karakterize cevaplar olarak kabul edilmektedir (Conrath et al., 2002). Patojen inokulasyonundan sonra 24., 48. ve 72. saattlerde oxo-C14-HSL ile uyarılmış bitkilerde uyarılmamış bitkilere göre H_2O_2 birikimi önemli ölçüde fazladır. Priming yapılmış bitkilerde H_2O_2

birikiminin fazla olması oxo-C14-HSL'nin sistemik dokularda hücrel savunma yanıtlarını arttırarak dayanıklılık reaksiyonlarını arttırdığını ve hızlandırdığını göstermektedir. Oxo-14-HSL ile priming yapılmış bitkilerde H_2O_2 bazal seviyesinin değişmemesi Schikora et al. (2011) tarafından da bildirilmiştir. Ancak bizim bulgularımızın aksine priming yapılan *Arabidopsis* bitkileri ile kontrol bitkileri arasında *Pst* inokulasyonundan sonraki H_2O_2 artışı benzer seviyelerdedir. Bu durum bitki türlerinin farklılığından kaynaklanabileceği gibi çalışılan etmenlerin patojen ilişkili moleküler yapılarının farklılıklarından da kaynaklanabilir. Thiamin (B1 vitanimi) (Ahn et al., 2007), riboflavin (B2 vitamin) (Zhang et al., 2009), p-aminobenzoik asit (PABA) (Song et al., 2013), B vitamini grubuna bağlı priming molekülleridir. Bu moleküller ile uyarılan bitki dayanıklılığının düzenlenmesinde H_2O_2 'nin merkezi rol oynadığı görülmektedir.

Yüksek bitkilerde ROS, plazma membranında lokalize olan NADPH oksidazlar, hücre duvarında bulunan peroksidazlar ve amin oksidazlar gibi farklı yollar tarafından oluşturulur (Neill et al., 2002). Membranda bulunan bu enzimler sitoplazmik NADPH'tan O_2^- 'ye elektron transfer ederek O_2^- 'yi oluştururlar. Daha sonra da süperoksit dismutaz enzimi (SOD) O_2^- 'den H_2O_2 oluşumunu düzenler. Respiratory burst oxidase homologu (RBOH) olarak da bilinen NADPH oksidazlar en çok çalışılan ROS üreten enzimlerdir ve hücre büyümesi ve gelişimi, bitki savunması, hücrel sinyal iletiminde önemli rollere sahiptir. ROS-ilişkili sinyalleşmede önemli bir rol oynarlar (Marino et al., 2012). Oxo-C14-HSL'nin hıyarda *RBOH* ekspresyon seviyesi üzerinde bir etkisi bulunmamıştır. Ancak *P. cubensis* inokulasyonu yapılan bitkilerde ekspresyon seviyesi erken saatlerden itibaren artmaya başlamıştır. Özellikle oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılan bitkilerdeki *RBOH* ekspresyonu kontrol bitkilerine göre istatistiksel olarak daha fazladır (Şekil 4.28). Çeşitli streslere karşı thiamin (priming molekülü) ile uyarılan bitki dayanıklılığında NADPH oksidazların anahtar rol oynadığı bildirilmektedir. Bu molekülün *Arabidopsis*'te *Sclerotinia sclerotiorum*'a karşı savunmada NADPH oksidaz ilişkili sinyal metabolizmasını aktive ettiği gözlenmiştir (Zhou et al., 2013).

Bitki hücre duvarı, yapısal olarak karmaşık bir dizilime sahip proteinler, şekerler ve fenollerden oluşur ve bitki gelişiminde çok önemli fonksiyonları yerine getirmesinin yanında patojenlere karşı savunmasında da kritik rol oynar (Hückelhoven et al., 1999; Wei and Shirsat, 2006; Hückelhoven, 2007; Deepak et al., 2010). Patojenlerin enfeksiyon yapıp hücre içinde yayılabilmeleri için pasif bariyer olan hücre duvarlarını yıkmalıdır (Cantu et al., 2008; Hematy et al., 2009).

Hücre duvarı ayrıca degradasyonu sırasında yayılan çok sayıdaki antimikrobiyal bileşikler için bir rezarvuardır (Schulze-Lefert, 2004; Vorwerk et al., 2004). Bitkiler, diğer ökaryotlarda olduğu gibi gelişim ve dışarıdan gelen uyaranlara cevap olarak hücre duvarı bütünlüğünü korumak ve yeniden düzenlemek için dinamik mekanizmalarına sahiptir (Wolf et al., 2012; Engelsdorf and Hamann, 2014). Patojen enfeksiyonu nedeniyle hücre duvarı bütünlüğünün bozulması sinyal moleküllerinin salınımına ve kompleks cevap mekanizmalarının oluşumuna yol açar (Cantu et al., 2008). Sekonder hücre duvarlarında fenolik bileşiklerin ve ligninin birikimi, kalloz oluşumu gibi olaylar patojen enfeksiyonuna karşı hücre duvarlarının güçlendirilmesini sağlarlar.

Kalloz yüksek moleküler ağırlığa sahip β -1,3-glukan polimerinden oluşan ve içerisinde antimikrobiyal bileşikler barındırabilen amorf bir yapıdır (Luna et al., 2011). Patojen saldırısını takiben oluşan kalloz birikimi patojen istilasına karşı yapısal bir bariyerdir. Ellinger et al., (2013) ve Jacobs et al., (2003) patojen enfeksiyonu ile oluşan kalloz birikiminin savunma mekanizmalarındaki önemini detaylı olarak incelemiştir. Oxo-C14-HSL ile priming yapılan bitkilerde *P. cubensis* inokulasyonu sonucu %248 oranında daha fazla kalloz birikimini tespit edilmiştir. Schenk et al., (2014) Arabidopsis'te *Pst*'ye karşı uyarılan AHL ilişkili dayanıklılıkta kalloz birikiminin önemli olduğunu bildirmiştir ve bu sonuçlar bizim verilerimizi doğrulamaktadır. Hexanoik asit (Fernández-Crespo et al., 2017), β -Aminobutirik asit (Ton and Mauch-Mani, 2004), laminarin (Gauthier et al., 2018) gibi birçok priming ajanının farklı patosistemlerde kalloz oluşumunu teşvik ederek dayanıklılığı arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca oxo-C14-HSL ile uyarılmış arpa bitkilerinde külleme etmenine karşı papilla oluşumu gözlenmiştir (Schikora et al., 2011). Papilla oluşumu, patojenin bitkiye giriş noktalarında reaktif oksijen türlerinin indüklemesi ile glikoproteinlerin çapraz bağlanması ve kalloz ve fenolik bileşiklerin birikmesi sonucu oluşur.

Bitki savunmasında sekonder metabolitlerin önemli rolleri vardır (Zaynab et al., 2018). AHL ile indüklenen bitkilere flg22 uygulaması sonucu flavonoid metabolizması ile ilgili genlerin ifadesinde önemli farklılıklar gözlenmiştir (Schenk et al., 2014). Bu veriler ışığında oxo-C14-HSL ile uyarılan hıyar bitkilerinde, *P. cubensis* enfeksiyonun hücre duvarlarındaki fenolik bileşikler ve lignin üzerine etkilerini araştırmamız gerektiği kanısına varılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre AHL ön uygulaması yapılan bitkilerde *P. cubensis* enfeksiyonu sonrası hücre duvarlarında önemli miktarda lignifikasyon gerçekleşmiştir. Ayrıca bu bitkilerde erken saatlerden itibaren toplam çözünebilir fenolik içeriği ve hücre

duvarına bağı fenolik bileşikler içeriği kontrol bitkilerine göre önemli oranda artmıştır. Bu sonuçlar AHL uygulamasının kalloz birikimi ve fenolik bileşikleri arttırmak yoluyla hücre duvarlarını güçlendirdiğini göstermektedir. Schenk et al., (2014) oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılmış bitkileri flg22 ile indüklemiş ve hücre duvarı ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında önemli değişimler tespit etmiştir. Transkriptom analizleri arabinogalaktan ve prolin içeriği yüksek proteinleri kodlayan genlerin ifadelerinin arttığını göstermiştir. Bu iki gen hidroksprolince zengin glikoprotein ailesi üyesidirler ve bitki hücre duvarının yapısal komponentleridir. Wei and Shirsat (2006), hidroksprolince zengin glikoproteinlerin çapraz bağlanmaları ve glikolizasyonun hücre duvarlarının sağlamlaştırılmasında önemli olaylar olduğunu ve patojenlerin istilasının sınırlamak için bitki savunmasına önemli katkılar sağladığını bildirmiştir. Ayrıca yine bu çalışmada hücre duvarını parçalayan bir enzim olan pektinazları, hücre duvarı ilişkili kinazları, G proteinlerini kodlayan genlerin ve flavonoid metabolizması ile ilişkili diğer bazı genlerin ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Biyokimyasal analizlerle de oxo-C14-HSL uygulaması yapılan bitkilerin *Pst* ile inokule edilmesinden sonra fenolik bileşiklerin, lignifikasyonun ve kalloz birikiminin arttığı ölçülmüştür ve bu veriler bizim bulgularımızla benzerlik göstermektedir.

Peroksidaz, polifenol oksidaz, fenilalanin amonyum liyaz, kitinaz ve β -1,3 glukanaaz gibi enzimler bitkilerde patojenlere karşı savunmada rol oynarlar (Sels et al., 2008). Peroksidazlar, hipersensitif reaksiyon, lignifikasyon, fenoliklerin ve glikoproteinlerin çapraz bağlanması, suberizasyon ve fitoaleksinin üretimi gibi bir çok önemli proseste görev alırlar (Almagro et al., 2008). Patojene karşı geliştirilen savunma cevaplarının başında gelen fenolik bileşiklerin ve ligninin üretimi fenilalanin amonyum liyaz enziminin aktivitesi ile gerçekleşmektedir (Kim and Hwang, 2014). β -1,3-glukanaazlar ise patojenlerin hücre duvarları komponentlerinin hidrolizinde çalışırlar (Balasubramanian et al., 2012). Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapıldıktan sonra *P. cubensis* ile inokule edilen bitkilerde 24-72 saatler arasında POD, PAL ve GLU aktivitesi artmıştır. Patojen inokule edilen kontrol bitkilerinde de bu enzimler artarken, priming yapılan gruplardaki artış tüm ölçüm saatlerinde istatistiksel olarak daha fazladır. Çeşitli priming moleküllerinin bitki patojenlerine karşı savunma ilişkili enzimleri aktive ederek dayanıklılığı uyardığı rapor edilmiştir (Sang et al., 2014). Örneğin BABA uygulaması kitinaz, β -1,3-glukanaaz ve peroksidaz aktivitelerini uyararak elmada mavi çürüklük hastalığına karşı savunmayı arttırmıştır (Zhang et al., 2011). Salisilik asit, oksalik asit ve kalsiyum klorid PAL ve PPO aktivitesini hızlı bir şekilde arttırarak

Alternaria alternata'ya karşı dayanıklılığı tetiklemiştir (Tian et al., 2006). Benzer sonuçlar diğer elisitörler olan (BTH, kitosan, oligokitosan) içinde ortaya konmuştur. AHL ilişkili dayanıklılıkta doğrudan savunma ilişkili enzimlerin aktivasyonlarının ölçüldüğü bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu proteinlerin oluşumundan sonraki genlerin ekspresyon seviyeleri çalışılmıştır. N-acyl-L-homoserin lakton üreten rizosfer bakterilerinin domateste fungal yaprak patojeni olan *Alternaria alternata*'ya karşı kitinaz ve β -1,3-glukanaz kodlayan genleri aktive etmiştir. Bunun yanında detoksifikasyon ilişkili enzimlerin aktivitesi üzerine AHL moleküllerinin etkileri bildirilmiştir.

Radyoaktif işaretli C8-HSL ve C10-HSL'in kullanıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre arpa bitkilerinde orta uzunlukta açıl zinciri uzunluğuna sahip bu moleküller ancak gövdenin alt kısmına kadar taşınabilmektedir. C6-HSL'nin aksine, uzun zincirli oxo-C14-HSL *Arabidopsis*'te gövdeye taşınmamaktadır (Schikora et al., 2011). Oxo-C14-HSL'nin gövdeye taşınmaması hıyarda tespit ettiğimiz *P. cubensis*'e karşı AHL ilişkili dayanıklılığın sistemik olduğunu göstermektedir. ISR ve SAR şimdiye kadar en iyi anlaşılmış sistemik dayanıklılık mekanizmalarıdır. Bunlardan ISR, JA/ET yolağına bağlı iken SAR, SA yolağına bağlıdır. Ancak SA ve JA yollarının birlikte çalıştığı (Thaler et al., 2012) ya da bu iki yoldan tamamen bağımsız (Ferrari et al., 2007) sistemik dayanıklılık mekanizmaları olduğu da bilinmektedir. Oxo-C14-HSL ile yapılan priming uygulaması sonucu ortaya çıkan dayanıklılık reaksiyonlarının transkripsiyonel mekanizmalarını ve SA ya da JA/ET yollarından hangisi ile ilişkili olduğunu araştırmak amacıyla ilgili bazı genlerde ekspresyon çalışmaları yürütülmüştür. AHL ilişkili dayanıklılık cevaplarının patojen varlığında ve yokluğunda değişimini izlemek amacıyla hem AHL uygulamasından hem de patojen inokulasyonundan sonra örneklemeler yapılmıştır. Bu iki dönemde yapılan örneklemeler reaksiyonların mekanizmaları hakkında bilgi sağlamıştır. SA yolağı için transkripsiyonel indikatör genler olan *PRI*, *NPR1*, *PR2*, *PAL*, *ICS* ve JA/ET yolağı için indikatör genler olan *LOX*, *COI1* seçilmiştir. Ayrıca sinyal iletiminde ve gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde önemli rollere sahip *WRKY50* ve *MAPK3* ekspresyonları incelenmiştir. Oxo-C14-HSL uygulaması yapılan bitkilerde bu bakılan genlerin hiçbirinde önemli bir değişim meydana gelmemiştir. AHL uygulamasından sonra 48 saate içinde ilgili genlerde transkripsiyonel bir yeniden düzenleme meydana gelmemesi oxo-C14-HSL'nin bir priming ajanı olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca bu olgu AHL'nin herhangi bir stres faktörü yokken bitkiye ekstra enerji yükü olmadığını göstermektedir. Ancak AHL

uygulamasından sonra *P. cubensis* inokulasyonu yapılan bitkilerde önemli transkripsiyonel düzenlemeler meydana gelmiştir.

Bitki gelişimi ve stres toleransının düzenlenmesinde çevresel uyaranları algılayıp hücre içine iletilmesini sağlayan kompleks mekanizmalar bulunmaktadır. Mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) sinyal kaskadı, ökaryotlarda çeşitli reseptörleri/sensörleri hücrel ve nükleer tepkilere bağlayan evrensel bir sinyal iletim modülüdür (Tena et al., 2001). MAPK sinyal modülü mayalarda, hayvanlarda ve bitkilerde (tüm ökaryotlarda) evrimsel olarak korunmuştur. Temel olarak MAPK sinyal kaskadı MAPK, MAPK kinaz (MAPKK), MAPKK kinaz (MAPKKK) isimli 3 farklı kinazdan oluşur. Bu kinazlar, fosforilasyon yoluyla bilgileri hücrel ortamdan transkripsiyonel ve metabolik yanıt merkezlerine kanallı eden, entegre eden ve arttıran sıralı sinyal aktarıcıları olarak işlev görür. MAPK kaskadları patojen enfeksiyonu (Pitzschke et al., 2009), yaralanma (Heinrich et al., 2011), kuraklık ve tuzluluk (Suarez and Fernandez, 2010), UV radyasyonu (Parages et al., 2013), ozon (Samuel et al., 2000) ve reaktif oksijen türleri (Pitzschke et al., 2009) gibi birçok abiyotik ve biyotik stres yanıtlarında görev almaktadır. MAPK kaskadının uyarılması patojenlerin algılanmasında meydana gelen ilk olaylardanır. *Arabidopsis*'te MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 kaskadı bulunan ilk sinyal modülüdür ve savunmanın başlatılmasında büyük öneme sahiptir (Asai et al., 2002; Galletti et al., 2011). *Arabidopsis*'te bulunan başka bir modül olan MEKK1-MKK1/2-MPK4, nekrotrof funguslara karşı savunmayı pozitif olarak düzenlerken, biyotrof patojenlere karşı negatif olarak düzenler (Qiu et al., 2008; Petersen et al., 2000). MAPK kaskadlarının SAR ve ISR'deki rolleri hakkında pek fazla bilgi yoktur (Vlot et al., 2008; Shah, 2009). AHL uygulanan bitkiler ile uygulanmayan bitkiler arasında *MAPK* ifadesinde bir değişim bulunmamıştır. *P. cubensis* inokulasyonundan sonra erken saatlerden itibaren (60 dk sonra) *MAPK3* ifadesi artmıştır ve AHL ön uygulaması yapılan bitkilerde bu artış daha fazladır. AHL ile priming yapılan *Arabidopsis* bitkilerinde AtMPK6 ve AtMPK3 aktivasyonu artış göstermiştir (Schikora et al., 2011). Ayrıca *Pst*'ye karşı oluşturulan AHL ilişkili dayanıklılık, mpk6 mutantında ortandan kalkarken, mpk3 mutantında devam etmiştir. Bu da AtMPK6'nın bakteriyel QS molekülleri ilişkili cevap oluşturulmasında rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca doğal suşlarda artış meydana gelen PR1 ekspresyonunun mpk6 mutantında değişmemesi de bu yargıyı desteklemektedir.

WRKY proteinleri bütün bitkilerde bulunan en büyük transkripsiyon faktörü ailelerindendir. Özellikle son 10 yılda bu proteinlerin fizyolojik ve biyokimyasal

süreçlerde önemli roller üstlendiğini gösteren birçok makale yayınlanmıştır (Lagace and Matton, 2004; Kloth et al., 2016). WRKY ailesi proteinleri, bir veya iki yüksek oranda korunmuş kısa peptid olan WRKYGQK ile korunmuş bir C2H2- veya C2HC- tipi çinko parmak motifini içeren, yaklaşık olarak 60 aminoasit kalıntısı olan ve yüksek oranda korunan bir domain olarak tanımlanır (Eulgem et al., 2000; Rushton et al., 2010). WRKY genleri abiyotik ve biyotik birçok çevresel stres tarafından uyarılan farklı yollarda görev alır ve bazı WRKY'ler aktive olmuş MAPK'ların direkt hedefidir (Eulgem and Samssich, 2007). WRKY proteinleri biyotik stres ile ilişkili birçok genin promotor bölgesindeki W-box elementlerle (TTGACC/T) direkt olarak etkileşime geçer (Rushton et al., 2010). *Arabidopsis*'le yapılan çalışmalar AtWRKY18 (Chen and Chen, 2002), AtWRKY38, AtWRKY62 (Kim et al., 2008), AtWRKY41 (Higashi et al., 2008), AtWRKY52 (Lahaye, 2002; Deslandes et al., 2003) ve AtWRKY70 (Li et al., 2004; Knoth et al., 2007) gibi birçok WRKY transkripsiyon faktörünün patojenlere karşı oluşturulan cevaplarda rol oynadığını göstermiştir. *N. benthamiana*'da *GhWRKY44* geninin ekotopik olarak ekspresyonunun artırılması *PR1*, *PR4*, *PR5* ve *NPR1* gibi savunma ilişkili genleri aktive ederek bakteriyel ve fungal hastalıklara karşı dayanıklılığı arttırmıştır (Li et al., 2015). Hıyarda *CsWRKY50* geninin aşırı ifade edilmesi fungus benzeri bir patojen olan *P. cubensis*'e karşı dayanıklılık sağlamıştır. Ayrıca *P. cubensis* enfeksiyonundan sonra SA ve JA için indikatör ve SA biyosentezinde görev alan genlerin de içinde bulunduğu fitohormon ilişkili genlerin transkripsiyon seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (Luan et al., 2019). Bizim çalışmamızda AHL uygulamaları tek başına *WRKY50* ekspresyonunu etkilememiştir. Ancak oxo-C14-HSL uygulamasından sonra 72. saatte yapılan *P. cubensis* inokulasyonunu takiben hızlı ve uzun süreli bir ekspresyon artışı izlenmiştir. AHL ile priming yapılan bitkilerde 24. saate kadar daha güçlü bir artış meydana gelmiştir. *AtWRKY22* ve *AtWRKY29* ekspresyonunun AHL ilişkili dayanıklılıkta arttığı, *AtWRKY18*'in ise değişmediği başka bir çalışmayla gösterilmiştir (Schikora et al., 2011).

Genel olarak SAR, patojenisite ile ilişkili proteinlerin aktivasyonu ile karakterize edilir (Hammond-Kosack and Jones, 1996). SA tabanlı savunma reaksiyonu, NPR1'in up regülasyonuna yol açan mitojen aktive edilmiş kinaz kaskadı aktivasyonunu içerir ve bu da, patojenisite ile ilişkili genlerin (PRs) transkripsiyonunu indükler (Gkizi et al., 2016; Yi et al., 2015). Tütün ve *Arabidopsis* gibi bitkilerde SAR oluşumu, PR proteinlerinin ekspresyonları ile yakından ilişkilidir (Ward et al., 1991; Uknes et al., 1992; Ryals et al., 1997; Hammerschmidt, 2007). Bunun aksine *PR* gen ekspresyonunun direkt artmadığı

SAR örnekleri de bulunmaktadır (Midoh, 1996; Graham et al., 2011; Graham et al., 2003). *Serratia liquefaciens* MG1 ırkı ve *Pseudomonas putida* IsoF tarafından üretilen kısa ve orta karbon zincirli AHL'lerin fungal patojen olan *Alternaria alternata*'ya karşı dayanıklılığı uyarmıştır ve AHL ilişkili dayanıklılık cevapları SA ve ET ilişkilidir (Hartmann et al., 2004; Schuëgger et al., 2006). Schenk et al. (2014), *Arabidopsis*'te AHL ile yapılan priming uygulamalarının moleküler mekanizmasını ortaya koymuştur. SA sinyal yolağı bozulan npr1-1 ve tga2/5/6 ve oksilipin sentezi bozulmuş lox2 mutantlarında AHL molekülleri dayanıklılığı uyaramamıştır. Ayrıca doğal suşlarda AHL uygulamasını takiben yapılan *Pst* inokulasyonu sonucunda (ya da flg22 uygulaması) SA ve OPDA hormonlarının konsantrasyonlarında artış meydana gelmiştir. Bu veriler SA ve oksilipin bağımlı yolların AHL ilişkili dayanıklılıktan sorumlu olduğunu göstermektedir.

PAL geni önemli bir savunma genidir ve SA biyotezinde rol oynar (Chen et al., 2009) Bitkilerin gelişim ve savunma için ihtiyaç duyduğu fitoaleksiner, lignin, hücre duvarındaki fenolik bileşikler ve patojenisite ile ilişkili enzimler gibi birçok madde fenilpropanoid metabolizma yolağında oluşturulur. PAL, bu yolda lignin ve fitoaleksiner sentezi için öncülük yapan anahtar enzimdir (Pellegrini et al., 1994). PAL'in erken savunma cevaplarında önemli rolü olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Kim and Hwang, 2014). Çalışmamızda 3 gün boyunca 5 µM dozunda oxo-14-HSL uygulaması yapılan bitkilere *P. cubensis* inokulasyonu yapılmış ve inokulasyondan sonra *PAL* geninin ekspresyon seviyeleri izlenmiştir. İnokulasyonu takiben 3. saatten itibaren son ölçüm yapılan 48. saate kadar her örnekleme zamanında *PAL* ekspresyonu AHL uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre daha fazladır. Özellikle 24. saatte izlenen fark dikkat çekici seviyededir. Hıyarda artışını tespit ettiğimiz hücre duvarı ilişkili fenolik bileşikler (çözünbilir ve hücre duvarına bağlı fenoller, lignin) ve savunma ilişkili enzimler PAL yolağının bir ürünüdür ve bu sonuçlarda *PAL* geni ekspresyon artışını desteklemektedir. *PAL* geni ekspresyonu BTH ile priming yapılan bitkilerde patojen infeksiyonu sonrası önemli artış göstermiştir (Kohler et al., 2002, Taheri and Tarighi, 2010). Ancak Schenk et al., (2014) bulgularımızın aksine SA ilişkili yolağın önemli indikatörlerinden biri olan *PAL* geninin ekspresyon seviyesinin AHL ilişkili sistemik dayanıklılıkta değişmediğini bildirmiştir.

Yüksek bitkilerde SA iki ayrı yoldan sentezlenir. Bunlar PAL yolağı ve ICS yolağıdır (Vlot et al., 2009; Miura and Tada 2014). Dong et al. (2004) göre hıyarda soğuk toleransı için gerekli SA üretiminden PAL enzimatik yolağı sorumludur. MNSV ile enfekte kavun yapraklarında ferulik asit sentezi için

fenilpropanoid yolağının merkezi enzimlerinden biri olan sinamic acid 4-hidroksilaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Bellés et al., 2008). MNSV ile yapılmış bir başka araştırmada ferulik asit üretiminden PAL yolağının, serbest salisilik asit üretiminden ise ICS yolağının sorumlu olabileceği görülmektedir (Fernández-Crespo et al, 2017). Çalışmamızda seviyesi arttığını düşündüğümüz salisilik asitin üretiminden hangi genin sorumlu olduğunu araştırdık. Oxo-C14-HSL uygulanmış ve *P. cubensis* inokulasyonu yapılmış bitkilerde erken saatlerden başlayan ve 48. saate kadar devam eden *PAL* ekspresyonu artışı gözlenmiştir. *ICS* ekspresyonu ise genel olarak sabit seyretmekle birlikte sadece 24. saatte priming yapılan bitkilerde artış göstermiştir. Bu veriler doğrultusunda AHL ilişkili olası SA artışında PAL yolağının ICS yolağına göre daha aktif çalıştığını söyleyebiliriz.

NPR1 (Non-expressor of pathogenesis related genes), transkripsiyonel koaktivatör olarak SA ile ilişkili transkripsiyonel olarak yeniden programlamanın ve dayanıklılığın merkezi düzenleyicisidir (Pajerowska-Mukhtar et al., 2012). Savunma cevaplarını aktive etmek için SA bazı spesifik reseptörlere bağlanmalıdır. NPR1 proteini bu reseptörler içerisinde en önemli olanıdır (Wu et al., 2012). Monomerik *NPR1* nükleusa girmekte ve savunma genlerinin transkripsiyonel aktivatörü olarak çalışmaktadır (Attaran and He, 2012; Fu et al., 2012). *Arabidopsis*'te yürütülen mikroyarray analizleri SA yolağı ile indüklenen savunma genlerinin %90'dan fazlasının *NPR1* ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Wang et al., 2006; Blanco et al., 2009). *NPR1*'de yapılan mutasyonlar SA ile ilişkili transkripsiyonel düzenlenmenin kaybolmasına ve biyotrofik ve hemibiyotrofik patojenlere karşı duyarlılığın artmasına neden olmaktadır (Shah et al., 1997; Dong, 2004). Bu örnekler SA ile düzenlenen transkripsiyonlar için *NPR1* gerekliliğini göstermektedir. Spoel et al. (2003) sitozolik *NPR1*'in, SA ve JA yolaklarının çapraz iletişimden sorumlu olabileceğini de bildirmiştir. Bizim çalışmamızda SA ilişkili diğer genlere paralel olarak *NPR1* ekspresyonu *P. cubensis* inokulasyonundan sonra hızlı bir artış göstermiştir ve bu artış AHL ile priming yapılan bitkilerde daha fazladır. SA yolağı bozulmuş olan *npr1-1* *Arabidopsis* mutantının kullanıldığı bir çalışmada *Pst*'ye karşı geliştirilen AHL ilişkili dayanıklılık reaksiyonları ortadan kalkmıştır (Schenk et al., 2014). Bu sonuçlar AHL ilişkili savunmada *NPR1*'in gerekli olduğunu göstermektedir.

Bitkilerde sistemik kazanılmış dayanıklılığın (SAR) bileşenleri olan patojenisite ile ilişkili (PR) proteinler, antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşiklerdir ve bitkilerin savunma durumunun anlaşılmasında ifadeleri sıkça araştırılır. PR proteinleri patojen ile etkileşimin ilk dakikalarından itibaren uyarılırlar. Bitkiler

patojenlerin saldırılarına karşı sipesifik PR proteinlerini koordine etme yeteneğine sahiptir (van Loon et al., 1994). PR proteinlerinin karakteristikleri ve oransal ekspresyon seviyeleri bitki türlerine göre değişkenlik gösterebilir (Ryals et al., 1997). Örneğin tütünde SAR sırasında *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4*, *PR5*, kitinazın asidik ve bazik isoformları, β -1,3-glukanaz genleri eksprese olurken (Ward et al., 1991) *Arabidopsis*'te sadece *PR1*, *PR2* ve *PR5* eksprese olmuştur (Uknes et al., 1992). Ancak *PR1* çoğu zaman baskın olarak üretilir ve ekspresyon seviyesi markör olarak kullanılır. *PR2* ailesine ait olan β -1,3-glukanaz, pek çok fungus ve fungus benzeri organizma türünün hücre duvarlarında bulunan β -1,3-glukanların hidrolizini katalize eder ve böylece antifungal aktivite sergiler (Shi et al., 2006). *PR2* proteinleri sağlıklı bitkilerde düşük miktarlarda bulunur, ancak biotrofik ya da nekrotrofik fungal etmenlerin enfeksiyonlardan sonra miktarları hızlıca artar (Aggarwal et al., 2011). *PR2* geninin ekspresyonu genellikle SA yolağı tarafından düzenlenir. Çalışmamız kapsamında hem *PR1* hem de *PR2* genlerine ait ekspresyon seviyelerinin patojen inokulasyonu yapılmayan kontrol ve AHL uygulamalarında değişmediğini tespit edilmiştir. Ancak *P. cubensis* inokulasyonundan sonra *PR1* geni ekspresyonunun güçlü ve uzun süren bir artış gösterdiği ve bu artışın AHL ile uyarılan gruplarda daha baskın olduğu izlenmiştir. *PR2* ekspresyonu ise inokulasyondan sonra 12. saatten itibaren artış göstermiştir. *PR2* geninin ekspresyon seviyesi de AHL ile priming yapılan gruplarda istatistiksel olarak daha fazladır. Gerçek fungusların aksine *P. cubensis* gibi fungus benzeri organizmaların hücre duvarlarında kitin oranı azdır (<%1). Kitin yerine yüksek miktarda glukan ve selüloz bulunur (Wessels and Sietsma, 1981). AHL ile priming yapılan bitkilerde *PR2* ekspresyonunun ve bu genin ürünü olan β -1,3-glukanaz enzimin aktivasyonunun artması, hücre duvarı yapısında yüksek oranda glukan içeren *P. cubensis* enfeksiyonunun baskılanmasını açıklayabilir. Oxo-C14-HSL üreten *S. meliloti* expR⁺ ırkının kolonize olduğu *Arabidopsis* bitkilerinde flg22 uygulaması sonucu *PR1* ekspresyonu artmıştır (Zarkani et al., 2013). Benzer şekilde AHL üreten *Serratia liquefaciens* MG1'in domatestte kolonizasyonu sırasında *PR1* ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir (Schuhegger et al., 2006). Schikora et al., (2011) ve Schenk et al. (2014)'ün *Arabidopsis* bitkilerinde yürüttüğü çalışmalarda da oxo-C14-HSL uygulamasından sonra patojen inokulasyonu takiben kontrol bitkilerine kıyasla güçlü bir *PR1* ekspresyonu meydana gelmiştir. Tüm bu sonuçlar bizim verilerimizi desteklemektedir.

Linolenik asitten türelen ve pentasiklik halka yapısı ile karakterize edilen jasmonatlar özellikle nekrotrof patojenlere ve herbivor böceklerle karşı bitki

savunma cevaplarının oluşturulmasında kritik rol oynarlar (Creelman and Mullet, 1997; Wasternack, 2007; Farmer et al., 2003). Jasmonatlar ayrıca kök büyümesi, tberizasyon, senesens ve üreme gibi birçok gelişimsel sürecin düzenlenmesine katılır (Cheng et al., 2009; McConn and Browse, 1996; Schommer et al., 2008). Son yıllarda jasmonik asit ve oksilipin türevleri gibi jasmonatların, böcek saldırısı (Hu et al., 2013), patojen enfeksiyonu (Balbi and Devoto 2008), UV radyasyonu (Demkura et al., 2010), kuraklık (Wathugala et al., 2012) gibi abiyotik ve biyotik streslerden bitkileri korumak için çok önemli savunma sinyalleri olarak çalıştıkları gösterilmiştir.

JA sentezinin ilk basamağı, bir fosfolipazın membran fosfolipitlerinden α -linolenik asiti (C18:3) ve hexadecatrienoic asiti (C16:3) salgıladığı membran kloroplastlarında meydana gelir (Hyun et al., 2008). Bitkilerde genellikle JA sentezi C18:3 ncleri araacılığı ile oktadekanoit yolağında gerçekleşir (Mueller et al., 1993). İkinci basamakta α LA kloroplastik 13-lipoksigenaz (13-LOX) aktivitesi ile okside edilerek linoleik asitin türevi olan 13-hidroperoksi üretimi gerçekleşir (Bannenberg et al., 2009). *Arabidopsis* genomunda lipoksigenaz kodlayan altı gen vardır ve bunların üç tanesi (*LOX2*, *LOX3* ve *LOX4*) JA biyosentezi ile ilişkilidir (Caldelari et al., 2011). Stres koşulları altında JA cevapları JASMONAT-ZIM-DOMAIN (JAZ) baskılayıcıları olarak adlandırılan bir grup nuklear protein tarafından kontrol edilir. JAZ baskılayıcılar, biyolojik olarak aktif JA'nın (JA-Ile) ortak alımında yer alan SCF (Skp-Cullin-F-box) kompleksinin ayrılmaz bir parçası olan F-box proteini COI1 (CORONATINE INSENSITIVE1) ile etkileşime girer (Thines et al., 2007). Çalışmamızda AHL uygulamasının *P. cubensis* varlığında *LOX* ve *COI1* geni ekspresyonları üzerine ilk 24 saat etkisi olmadığı bulunmuştur. Ancak 48. saatte yapılan ölçümler hem *LOX* geninin hem de *COI1* geninin AHL ile uyarılan gruplarda kontrol gruplarına göre daha fazla eksprese olduğu kaydedilmiştir. JA yolağı bozulmuş *Arabidopsis* *Coil-16* ve *jar1-1* mutantlarında AHL ilişkili dayanıklılık cevaplarının ortadan kalktığı görülmüştür. Benzer şekilde oxo-C14-HSL uygulaması JA'ya cevap oluşturan *MYC2* ve *VSP2* genlerinin ekspresyonlarını değiştirmemiş ve JA (ve JA-Ile) birikimine neden olmamıştır. Bu verilere dayanarak Schenk et al (2014), AHL ilişkili dayanıklılıkta JA ve ISR mekanizmalarının görev almadığını bildirmiştir. JA öncülerinden olan oksilipinlerin stres cevaplarında rol oynadığı bilinmektedir. Schenk et al (2014)'a göre AHL ilişkili dayanıklılıkta SA birikiminin yanında cis-OPDA oksilipinin de birikimi artmıştır. Ayrıca oluşturalan cevap reaksiyonları için *LOX2* lipoksigenaz ve TGA2/5/6

transkripsiyon faktörleri gereklidir ve reaksiyonlar *COL*'den bağımsız gerçekleşmektedir.

Stomalar, yaprak yüzeyinde, bitkilerin çevre ile gaz alışverişinde bulunmalarını sağlayan küçük gözeneklerdir. Fotosentezde CO₂ alımında önemli bir rol oynarlar ve aynı zamanda transpirasyonu düzenlerler. Bitki dokuları ve çevre arasındaki pozisyonları nedeniyle patojenlerin doku içerisine girip endofit olarak kolonize olabilmeleri için uygun birer kapıdırlar. Bu nedenle bitkiler sadece absisik asit gibi hormonlar ve ışık, oransal nem, karbondioksit gibi çevresel streslere değil aynı zamanda patojenlere cevap olarak da stoma açıklıklarını kontrol etme mekanizmalarına sahiptir (Melotto et al., 2017).

Oomycete grubu yaprak patojenlerin stoma açıklıkları üzerine etkileri konusunda çok az çalışma bulunmaktadır. Diğer patojenlerin neden olduğu etkilere ters olarak, oomycete patojenlerinin hem yeşil hem de klorotik dokularda stoma açıklıklarını arttırdığı tespit edilmiştir (Oerke et al., 2006; Lindenthal et al., 2005). *Plasmopara viticola* ile enfekteli bağ yapraklarının su kıtlığı durumunda sağlıklı bitkilerine göre daha uzun süre stomalarını açık tuttuğu bildirilmiştir (Allegre et al., 2007). Aydınlik süreçte sağlıklı yapraklar hızlı bir şekilde stomalarını kapatırken, *P. viticola* ile enfekteli yaprakların stomalarını açık tutma süreleri daha fazladır. Ayrıca karanlık süreçte de hasta yapraklar sağlıklı yaprakların aksine stomalarını açık tutmuştur. Bu çalışmada AHL moleküllerinin bitki stoma hareketleri üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Ancak *P. cubensis* inokulasyonundan 12 saat sonra stoma açıklıklarının arttığı gözlenmiştir ve bu artış kontrol grupları ile oxo-C14-HSL gruplarında benzer seviyededir. Bu sonuçlar AHL ilişkili dayanıklılıkta stoma hareketliliğinin bir etkisi olmadığını göstermiştir. Oomycete patojenlerinin neden olduğu artan stoma açıklığını, patojen tarafından veya enfekte olmuş bitkinin patojene reaksiyonu sonucu üretilen bir molekülden kaynaklanabilir. Schenk et al. (2014) *Arabidopsis*'te AHL moleküllerinin stoma açıklıkları üzerine direkt etkisi olmadığını ancak AHL ile priming yapılan bitkilerde *Pst* enfeksiyonu sonucu bitkilerin stomalarını hızlı bir şekilde kapatarak patojen girişini sınırladığını bildirmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hayvansal organizmalarda olduğu gibi aktive edilen savunma mekanizmaları bitkilerde de aşırı enerji tüketimine neden olur. Bu nedenle yüksek bitkilerdeki savunma sistemleri etkin bir şekilde koordine edilmedir. Bitkiler, savunma reaksiyonlarında daha düşük enerji harcamaları için birçok farklı mekanizma geliştirmişlerdir ve bunlar etkin bir şekilde koordine edilmektedir. Örneğin patojen yokluğunda savunma cevaplarını baskılayan negatif düzenleyiciler bu mekanizmalara örnek olarak verilebilir. Ayrıca bitkiler savunma reaksiyonlarının düzenlenmesinde priming mekanizmasını etkin olarak kullanmaktadır. Bu olgu tarımda 1930'lu yıllardan beri kullanılmaktadır. Priming genellikle uyarılmış dayanıklılığın bir parçası olarak tanımlanır ancak priming cevapları uyarılan dokuya bir stres faktörü ulaştığında ortaya çıkar. Yani bitki herhangi bir stres ile karşılaşmadığı sürece savunma mekanizmalarını aktif çalışır durumda tutmaz. β -aminobütirik asit (BABA) ve düşük konsantrasyonda SA priming uyarıcıları içerisinde en popüler olanlardır. Bunların yanında hexanoik asitin, lipopolisakkaritlerin, acibenzolar-S-methylin, azelaik asitin, riboflavinin bitkiler üzerinde priming molekülü olarak savunmayı etkilediği bilinmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada farklı özelliklere sahip en yaygın kullanılan 3 AHL molekülünün geniş bir konsantrasyon serisi kullanarak hıyar bitkileri üzerine etkilerini araştırdık. Bulgularımız, literatür verilerine paralellik göstererek kısa ve orta karbon zinciri uzunluğuna sahip AHL'lerin bitki primer kök uzunluğunu ve kök fenotipini etkileyerek büyümeyi ve gelişmeyi teşvik ettiğini, uzun karbon zincirine sahip AHL molekülünün ise *P. cubensis* ve *Psl*'ye karşı bitki sistemik dayanıklılığı uyardığını göstermiştir. Bitkiye sekonder bir stres (*P. cubensis* ya da *Psl*) ulaşıncaya kadar oxo-C14-HSL uygulanan bitkiler ve kontrol bitkileri arasında bitki savunma cevapları açısından bir farklılık olmaması, AHL'nin bir priming molekülü gibi çalıştığını göstermektedir. Stres faktörü ortada yokken bitki enerji metabolizması üzerinde ekstra yük yaratmaması tarımda kullanımı açısından potansiyelini arttırmaktadır. Oxo-C14-HSL ön uygulaması yapılan bitkiler *P. cubensis* ile inokule edildiğinde ön uygulama yapılmamış kontrol bitkilerine göre daha fazla kalloz, lignin ve hücre duvarlı ilişkili fenolik bileşikler biriktirmiştir. Ayrıca priming uygulaması yapılan bitkilerde enfeksiyondan sonra daha fazla H_2O_2 , O_2^- birikimi ve savunma ilişkili enzim aktivitesi görülmüştür. Bu veriler AHL ilişkili savunmada hücre duvarının güçlendirilmesi gibi fiziksel ve patojenisite ilişkili enzimlerin birikimi gibi kimyasal savunma faktörlerinin görev aldığını göstermektedir. Gen ekspresyon verileri AHL ilişkili savunmanın daha

çok SA metabolizması ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ancak özellikle enfeksiyonun ileri saatlerinde *COII* ve *LOX* ekspresyonlarının artış göstermesi JA'nın de işin içinde olabileceğine işaret etmektedir.

Dünya nüfusunun artışına paralel olarak artan gıda talebi ve sağlıklı beslenme konusundaki artan farkındalık günümüzde tarım endüstrisi içinde yeni yaklaşımlara yön vermektedir. Etkili ve sürdürülebilir bitki koruma yöntemleri yeterli ve yüksek kalitede gıda üretmek için çok önemlidir. Bunlar arasında biyolojik ajanların kullanıldığı yöntemler her geçen gün artmaktadır. *Trichoderma harzianum* gibi funguslar ve *Bacillus* spp. *Serratia* spp. *Pseudomonas* spp. gibi bakteriler bitki koruma pazarında yaygın olarak kullanılan etmenlerdir. Ancak bu etmenlerin bitkiler üzerindeki etkilerinin mekanizmaları tam olarak aydınlatılamıştır. Gram negatif bakterilerin yaygın olarak ürettiği N-açıl-homoserin laktonlar önemli QS molekülleridir. Ancak birçok araştırma (Schikora et al., 2016) ve bizim bulgularımız, bitkilerin AHL moleküllerini algıladığı ve bunlara karşı birçok kompleks sinyal mekanizmaları aracılığı ile arttırılmış savunma cevapları oluşturduğunu göstermektedir. AHL'lerin bitki korumada kullanılması yeni bir strateji olma potansiyeli taşımaktadır. Yapılan çalışmalar AHL üreten bakterilerin doğrudan kullanılabileceğini ve başarılı sonuçlar sağladığını göstermektedir. Bununla birlikte bu moleküller saf olarak üretilmektedir. Henüz in vitro düzeyde araştırma çalışmaları için üretildiklerinden maliyetleri çok yüksektir. Tarım dışındaki farklı alanlarda da bakteriyel quorum algılama molekülleri ile ökaryotik konukçular arasındaki etkileşimin daha iyi anlaşılması yeni olanakların bulunmasına yardımcı olacaktır. Tıpta enfeksiyöz hastalıklara karşı koruma buna örnek olarak verilebilir.

Bugüne kadar AHL ilişkili dayanıklılık reaksiyonları ve bunların mekanizmaları daha çok model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da çalışılmıştır. Domateste, buğdayda ve arpada daha çok yüzeysel çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmamız, bir kültür bitkisinde AHL ilişkili gelişim ve dayanıklılık reaksiyonlarının ayrıntılı olarak ortaya konduğu ilk çalışmadır. Ancak, hıyar bitkisinin fizyolojisi ve genetiği konusunda kısıtlı bilgiye sahip olmamız ve mutant hatlara sahip olmamamız, reaksiyonların belirlenmesinde detaylara inmemizi ve bazı noktalarda verilerimizi çapraz kontrol etmemizi engellemiştir. Buna rağmen araştırmamız literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abeles, F. B., Bosshart, R. P., Forrence, L. E., and Habig, W. H., 1971,** Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves, *Plant Physiol*, 47(1), 129-134pp.
- Adams ML., and Quesada-Ocampo LM., 2014** Evaluation of fungicides for control of downy mildew on cucumber, Kinston *Plant Dis Management Rep* 8: V240.
- Aggarwal, R., Purwar, S., Kharbikar, L. L., and Gupta, S., 2011,** Induction of a wheat β -1,3-glucanase gene during the defense response to *Bipolaris sorokiniana*, *Acta phytopathologica et entomologica Hungarica*, 2011 v.46 no.1(no. 1), pp. 39-47pp.
- Agrios, G. N., (2005),** Preface. In G. N. Agrios (Ed.), *Plant Pathology (Fifth Edition)* (pp. xix-xx). San Diego: Academic Press.
- Ahn, I. P., Kim, S., and Lee, Y. H., 2005,** Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance, *Plant Physiol*, 138(3), 1505-1515pp.
- Ahn, I. P., Kim, S., Lee, Y. H., and Suh, S. C., 2007,** Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 143(2), 838-848pp.
- Allègre, M., Daire, X., Héloir, M.-C., Trouvelot, S., Mercier, L., Adrian, M., and Pugin, A., 2007,** Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves, *New Phytologist*, 173(4), 832-840pp.
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., and Pedreño, M. A., 2008,** Class III peroxidases in plant defence reactions, *J Exp Bot*, 60(2), 377-390pp.
- Andersen, A. S., Joergensen, B., Bjarnsholt, T., Johansen, H., Karlsmark, T., Givskov, M., and Krogfelt, K. A., 2010,** Quorum-sensing-regulated virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* are toxic to *Lucilia sericata* maggots, *Microbiology*, 156(Pt 2), 400-407pp.
- Aranega-Bou, P., de la, O. L. M., Finiti, I., Garcia-Agustin, P., and Gonzalez-Bosch, C., 2014,** Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model, *Front Plant Sci*, 5, 488pp.
- Arnon, D. I., 1949,** Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *beta vulgaris*, *Plant Physiol*, 24(1), 1-15pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Asada, K.**, 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiol*, 141(2), 391-396pp.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., and Sheen, J.**, 2002, MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity, *Nature*, 415(6875), 977-983pp.
- Attaran, E., and He, S. Y.**, 2012, The long-sought-after salicylic acid receptors, *Mol Plant*, 5(5), 971-973pp.
- Azami-Sardoei, Z., de Carvalho França, S., De Vleeschauwer, D., and Höfte, M.** (2010). *Riboflavin induces resistance against Botrytis cinerea in bean, but not in tomato, by priming for a hydrogen peroxide-fueled resistance response*, *PMPP Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol.75 No.1/2 pp.23-29pp
- Bai, X., Todd Cd Fau - Desikan, R., Desikan R Fau-Yang, Y., Yang Y Fau - Hu, X., and Hu, X.**, 2012, N-3-oxo-decanoyl-L-homoserine-lactone activates auxin-induced adventitious root formation via hydrogen peroxide- and nitric oxide-dependent cyclic GMP signaling in mung bean, *Plant Physiology*, 158(2):725-36. (1532-2548pp)
- Baider, A., and Cohen, Y.**, 2003, Synergistic interaction between BABA and mancozeb in controlling *Phytophthora infestans* in potato and tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber, *Phytoparasitica*, 31(4), 399-409pp.
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., and Sakthivel, N.**, 2012, Plant beta-1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi, *Biotechnol Lett*, 34(11), 1983-1990pp.
- Balbi, V., and Devoto, A.**, 2008, Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios, *New Phytol*, 177(2), 301-318pp.
- Balmer, A., Pastor, V., Gamir, J., Flors, V., and Mauch-Mani, B.**, 2015, The 'prime-ome': towards a holistic approach to priming, *Trends in Plant Science.*, 20(7):443-52 p

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bannenberg, G., Martinez, M., Hamberg, M., and Castresana, C.,** 2009, Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*, *Lipids*, 44(2), 85-95pp.
- Barnard, A. M., Bowden, S. D., Burr, T., Coulthurst, S. J., Monson, R. E., and Salmond, G. P.,** 2007, Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362(1483), 1165-1183pp.
- Barnes, W.C. and Epps, W.M.,** 1954, An unreported type of resistance to cucumber downy mildew. *Plant Dis. Rep.* 38, 620.
- Barth, C., Jakubczyk, D., Kubas, A., Anastassacos, F., Brenner-Weiss, G., Fink, K., Schepers, U., Bräse, S., and Koelsch, P.,** 2012, Interkingdom signaling: integration, conformation, and orientation of N-acyl-L-homoserine lactones in supported lipid bilayers, *Langmuir*, 28(22), 8456-8462pp.
- Bassler, B. and Vogel, J.,** 2013, Bacterial regulatory mechanisms: the gene and beyond, *Curr Opin Microbiol*, 16(2):109-11pp.
- Bassler, B. L.,** 1999, How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing, *Curr Opin Microbiol*, 2(6):582-7p
- Bassler, B. L., Wright, M., and Silverman, M. R.,** 1994, Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway, *Mol Microbiol*, 13(2), 273-286pp.
- Bauer, W. D., and Mathesius, U.,** 2004, Plant responses to bacterial quorum sensing signals, *Curr Opin Plant Biol*, 7(4), 429-433pp.
- Bedlan, G.,** 1989. Erstmaliger Nachweis von Oosporen von *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rost. An Gewächshausgurken in Österreich. *Pflanzenschutzberichte*, 3, 119–120.
- Bellés, J. M., López-Gresa, M. P., Fayos, J., Pallás, V., Rodrigo, I., and Conejero, V.,** 2008, Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants, *174*(5), 524-533pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bellini, C., Pacurar Di Fau - Perrone, I., and Perrone, I.**, 2014, Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences, *Annu Rev Plant Biol.*,4;65:639-66 p
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., Baldani, J. I., and Passaglia, L. M. P.**, 2013, Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil, *Applied Soil Ecology*, 63, 94-104pp.
- Berg, G.**, 2009, Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture, *Appl Microbiol Biotechnol*, Aug;84(1):11-8.pp
- Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D.**, 2008, New insights into nitric oxide signaling in plants, *Annu Rev Plant Biol*, 59, 21-39pp.
- Bhattacharya, A., Sood, P., and Citovsky, V.**, 2010, The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection, *Mol Plant Pathol*, 11(5), 705-719pp.
- Blanco, F., Salinas, P., Cecchini, N. M., Jordana, X., Van Hummelen, P., Alvarez, M. E., and Holuigue, L.**, 2009, Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis*, *Plant Mol Biol*, 70(1-2), 79-102pp.
- Blum, M., Waldner, M., Olaya, G., Cohen, Y., Gisi, U., and Sierotzki, H.**, 2011, Resistance mechanism to carboxylic acid amide fungicides in the cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*, *Pest Manag Sci*, 67(10), 1211-1214pp.
- Boller, T., and Felix, G.**, 2009, A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors, *Annual Review Plant Biology*,.60:379-406pp.
- Booker F., Burkey K., Morgan P., Fiscus E., and Jones A.**, 2012, Minimal influence of G-protein null mutations on ozone-induced changes in gene expression, foliar injury, gas exchange and peroxidase activity in *Arabidopsis thaliana* L., *Plant Cell Environ.* 35(4): 668–681pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Borges, A. A., Borges-Perez, A., and Fernandez-Falcon, M.,** 2003, Effect of menadione sodium bisulfite, an inducer of plant defenses, on the dynamic of banana phytoalexin accumulation during pathogenesis, *J Agric Food Chem*, 51(18), 5326-5328pp.
- Borges, A. A., Borges-Pérez, A., and Fernández-Falcón, M.,** 2004, Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments, *Crop Protection*, 23(12), 1245-1247pp.
- Boubakri, H., Wahab, M. A., Chong, J., Bertsch, C., Mliki, A., and Soustre-Gacougnolle, I.,** 2012, Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defense responses, including HR like-cell death, *Plant Physiol Biochem*, 57, 120-133pp.
- Bradford, M. M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254pp.
- Brennan, T., and Frenkel, C.,** 1977, Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear, *Plant Physiol*, 59(3), 411-416pp.
- Burkhardt A. and Day.B.,** 2015, Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Michigan State Univ., East Lansing, MI 48824; B. Day, Graduate Program in Genetics and Dep. of Plant, Soil and Microbial Sciences, Michigan State Univ., East Lansing, MI 48824.
- Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E. E., and Dong, X.,** 2011, Arabidopsis lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest, *Plant Mol Biol*, 75(1-2), 25-33pp.
- Call, A., D., Criswell, A., Wehner, T., Klosinska, U., U., Kozik, E.,** 2012.. Screening Cucumber for Resistance to Downy Mildew Caused by (Berk. and Curt.) Rostov, *Crop Science*. 10.2135/cropsci2011.06.0296.
- Camanes, G., Scalschi, L., Vicedo, B., Gonzalez-Bosch, C., and Garcia-Agustin, P.,** 2015, An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in *Solanum lycopersicum*, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae*, *Plant J*, 84(1), 125-139pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Campos-Cuevas, J. C., Pelagio-Flores, R., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Ortiz-Castro, R., and López-Bucio, J.,** 2008, Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation, *Plant Science*, 174(2), 165-173pp.
- Cantu, D., Vicente, A. R., Labavitch, J. M., Bennett, A. B., and Powell, A. L.,** 2008, Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility, *Trends Plant Sci*, 13(11), 610-617pp.
- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., and Lu, B.,** 2010, Effect of BTH on anthocyanin content and activities of related enzymes in Strawberry after harvest, *J Agric Food Chem*, 58(9), 5801-5805pp.
- Caparrotta S., Boni S., Taiti C., Palm E., Mancuso S., Pandolfi C.,** 2018, Induction of priming by salt stress in neighboring plants *Environmental and Experimental Botany Volume* 147, 261-270pp
- Chan K., Y., Dorahy C., and Tyler S.,** 2007, Determining the agronomic value of composts produced from greenwaste from metropolitan areas of New South Wales, Australia *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47-1377-1382pp
- Chang, C. Y., Krishnan, T., Wang, H., Chen, Y., Yin, W. F., Chong, Y. M., Tan, L. Y., Chong, T. M., and Chan, K. G.,** 2014, Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against N-acyl homoserine lactone synthase as druggable target, *Sci Rep*, 4, 7245pp.
- Charlton, T. S., de Nys, R., Netting, A., Kumar, N., Hentzer, M., Givskov, M., and Kjelleberg, S.,** 2000, A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm, *Environ Microbiol*, 2(5), 530-541pp.
- Chen, C., and Chen, Z.,** 2002, Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor, *Plant Physiol*, 129(2), 706-716pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, J. G., Pandey, S., Huang, J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Assmann, S. M., and Jones, A. M.,** 2004, GCR1 can act independently of heterotrimeric G-protein in response to brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis* seed germination, *Plant Physiol*, 135(2), 907-915pp.
- Chen, W. W., Yang JI Fau - Qin, C., Qin C Fau - Jin, C. W., Jin Cw Fau - Mo, J. H., Mo Jh Fau - Ye, T., Ye T Fau - Zheng, S. J., and Zheng, S. J.,** 2010, Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 154(2):810-9p
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., and Fan, B.,** 2009, Biosynthesis of salicylic acid in plants, *Plant Signal Behav*, 4(6), 493-496pp.
- Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H. M., Cheng, Z., Xie, D., and Peng, J.,** 2009, Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*, *PLoS Genet*, 5(3), e1000440p.
- Chernin, L., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Kim, S., Ben-Ari, J., Khmel, I., and Vainstein, A.,** 2011, Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles, *Environ Microbiol Rep*, 3(6), 698-704pp.
- Cheval, C., Aldon, D., Galaud, J. P., and Ranty, B.,** 2013, Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity, *Biochim Biophys Acta*, 1833(7), 1766-1771pp.
- Choi, Y. J., Hong, S. B., and Shin, H. D.,** 2005, A re-consideration of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli* based on molecular and morphological data, *Mycol Res*, 109(Pt 7), 841-848pp.
- Churchill, M.E.A. and Herman, J.P.,** 2008, In: Chemical Communication Among Bacteria, *ASM Press*, pp. 275-290.
- Cohen, Y.,** 1981, Downy mildew of cucurbits, In D. M. Spencer (Ed.), The downy mildews, pp. 341–354, London: Academic
- Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., and Jaskiewicz, M. R.,** 2015, Priming for enhanced defense, *Annu Rev Phytopathol*, 53, 97-119pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Conrath, U., Pieterse, C. M., and Mauch-Mani, B.,** 2002, Priming in plant-pathogen interactions, *Trends Plant Sci*, 7(5), 210-216pp.
- Corbett, M., Virtue, S., Bell, K., Birch, P., Burr, T., Hyman, L., Lilley, K., Poock, S., Toth, I., and Salmond, G.,** 2005, Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway, *Mol Plant Microbe Interact*, 18(4), 334-342pp.
- Creelman, R. A., and Mullet, J. E.,** 1997, Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 355-381pp.
- Czajkowski, R., and Jafra, S.,** 2009, Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules, *Acta Biochim Pol*, 56(1), 1-16pp.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Breusegem, F.,** 2000, Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cell Mol Life Sci*, 57(5), 779-795pp.
- Davis, B. M., Jensen, R., Williams, P., and O'Shea, P.,** 2010, The interaction of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules with biological membranes: implications for inter-kingdom signaling, *PLoS One*, 5(10), e13522p.
- Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R. K., Muck, A., Mithöfer, A., and Shetty, S. H.,** 2010, Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence, *Journal of Phytopathology*, 158(9), 585-593pp.
- Demkura, P. V., Abdala, G., Baldwin, I. T., and Ballare, C. L.,** 2010, Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense, *Plant Physiol*, 152(2), 1084-1095pp.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.,** 2003, Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 8024-8029pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P.**, 2010, Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions, *Nature Reviews Genetics*, volume 11, (1471-0064), 539–548pp.
- Dong, H., and Beer, S. V.**, 2000, Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway, *Phytopathology*, 90(8), 801-811pp.
- Dong, X.**, 2004, NPR1, all things considered, *Curr Opin Plant Biol*, 7(5), 547-552pp.
- Dong, Y. H., and Zhang, L. H.**, 2005, Quorum sensing and quorum-quenching enzymes, *J Microbiol*, 43 Spec No, 101-109pp.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., and Zhang, L. H.**, 2001, Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase, *Nature*, 411(6839), 813-817pp.
- Dong, Y. H., Wang, L. Y., and Zhang, L. H.**, 2007, Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362(1483), 1201-1211pp.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., and Zhang, L. H.**, 2000, AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3526-3531pp.
- Dong, H. and Beer S. V.**, 2000, Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway, *Phytopathology* 90 801e811.
- Eckardt N., A.**, 2004, Absciscic Acid Signal Transduction: Function of G Protein–Coupled Receptor 1 in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 16(6): 1353–1354pp
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., and Daayf, F.**, 2010, Chitosan in plant protection, *Mar Drugs*, 8(4), 968-987pp.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S. C., and Voigt, C. A.**, 2013, Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 161(3), 1433-1444pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Engelsdorf, T., and Hamann, T.,** 2014, An update on receptor-like kinase involvement in the maintenance of plant cell wall integrity, *Ann Bot*, 114(6), 1339-1347pp.
- Eulgem, T., and Somssich, I. E.,** 2007, Networks of WRKY transcription factors in defense signaling, *Curr Opin Plant Biol*, 10(4), 366-371pp.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., and Somssich, I. E.,** 2000, The WRKY superfamily of plant transcription factors, *Trends Plant Sci*, 5(5), 199-206pp.
- Farmer, E. E., Almeras, E., and Krishnamurthy, V.,** 2003, Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory, *Curr Opin Plant Biol*, 6(4), 372-378pp.
- Fekete, A., Kuttler, C., Rothballer, M., Hense, B. A., Fischer, D., Buddrus-Schiemann, K., Lucio, M., Muller, J., Schmitt-Kopplin, P., and Hartmann, A.,** 2010, Dynamic regulation of N-acyl-homoserine lactone production and degradation in *Pseudomonas putida* IsoF, *FEMS Microbiol Ecol*, 72(1), 22-34pp.
- Fernandez-Crespo, E., Navarro, J. A., Serra-Soriano, M., Finiti, I., Garcia-Agustin, P., Pallas, V., and Gonzalez-Bosch, C.,** 2017, Hexanoic Acid Treatment Prevents Systemic MNSV Movement in Cucumis melo Plants by Priming Callose Deposition Correlating SA and OPDA Accumulation, *Front Plant Sci*, 8, 1793p.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F. M., and Dewdney, J.,** 2007, Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires phytoalexin deficient3, *Plant Physiol*, 144(1), 367-379pp.
- Filippou, P., Tanou, G., Molassiotis, A., and Fotopoulos, V.** (2012). Plant Acclimation to Environmental Stress Using Priming Agents, *Springer*, 1-28 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Finiti, I., de la, O. L. M., Vicedo, B., Gomez-Pastor, R., Lopez-Cruz, J., Garcia-Agustin, P., Real, M. D., and Gonzalez-Bosch, C., 2014,** Hexanoic acid protects tomato plants against *Botrytis cinerea* by priming defence responses and reducing oxidative stress, *Mol Plant Pathol*, 15(6), 550-562pp.
- Finnegan, T., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., and Dubery, I. A., 2016,** The Lipopolysaccharide-Induced Metabolome Signature in *Arabidopsis thaliana* Reveals Dynamic Reprogramming of Phytoalexin and Phytoanticipin Pathways, *PLoS One*, 11(9), e0163572p.
- Fischer, M., and Bacher, A., 2006,** Biosynthesis of vitamin B2 in plants, *Physiologia Plantarum*, 126(3), 304-318pp.
- Flors, V., Leyva Mde, L., Vicedo, B., Finiti, I., Real, M. D., Garcia-Agustin, P., Bennett, A. B., and Gonzalez-Bosch, C., 2007,** Absence of the endo-beta-1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato, *Plant J*, 52(6), 1027-1040pp.
- Frederix, M., and J Downie, A., 2011.,** Quorum Sensing: Regulating the Regulators, *Advanced Microbial Physiology*, 58:23-80pp.
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Carlson, J. E., and De Moraes, C. M., 2008,** Plant Defense Priming against Herbivores: Getting Ready for a Different Battle, *Plant Physiology*, 146(3), 818-824pp.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S. H., Tada, Y., Zheng, N., and Dong, X., 2012,** NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants, *Nature*, 486(7402), 228-232pp.
- Fuqua, W. C., and Winans, S. C., 1994,** A LuxR-LuxI type regulatory system activates Agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite, *Journal of Bacteriology*;176(10):2796-806p
- Galletti, R., Ferrari, S., and De Lorenzo, G., 2011,** Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*, *Plant Physiol*, 157(2), 804-814pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gamir, J., Sanchez-Bel, P., and Flors, V.**, 2014, Molecular and physiological stages of priming: how plants prepare for environmental challenges, *Plant Cell Rep*, 33(12), 1935-1949pp.
- Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J. B., and Bauer, W. D.**, 2003, Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing, *Mol Plant Microbe Interact*, 16(9), 827-834pp.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A.**, 2006, Early signaling events induced by elicitors of plant defenses, *Mol Plant Microbe Interact*, 19(7), 711-724pp.
- Gauthier, A., Trouvelot, S., Kelloniemi, J., Frettinger, P., Wendehenne, D., Daire, X., Joubert, J. M., Ferrarini, A., Delledonne, M., Flors, V., and Poinssot, B.**, 2018, Correction: The Sulfated Laminarin Triggers a Stress Transcriptome before Priming the SA- and ROS-Dependent Defenses during Grapevine's Induced Resistance against *Plasmopara viticola*, *PLoS One*, 13(3), e0194327p.
- Ge Yong-Hong, B. Y., LI Yong-Cai, and Wang Yi**, 2012, Resistance of Harvested Fruits and Vegetables to Diseases Induced by ASM and Its Mechanism, *Scientia Agricultura Sinica*, 45(16), 3357-3362pp.
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., and Laloi, C.**, 2006, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, *Bioessays*, 28(11), 1091-1101pp.
- Gilson, L., Kuo, A., and Dunlap, P. V.**, 1995, AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins, *J Bacteriol*, 177(23), 6946-6951pp.
- Gkizi, D., Lehmann, S., L'Haridon, F., Serrano, M., Paplomatas, E. J., Metraux, J. P., and Tjamos, S. E.**, 2016, The Innate Immune Signaling System as a Regulator of Disease Resistance and Induced Systemic Resistance Activity Against *Verticillium dahliae*, *Mol Plant Microbe Interact*, 29(4), 313-323pp.
- Glazebrook, J.**, 2005, Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens, *Annu Rev Phytopathol*, 43, 205-227pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Goyer, A.**, 2010, Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions, *Phytochemistry*, 71(14-15), 1615-1624pp.
- Gozzo, F., and Faoro, F.**, 2013, Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field, *J Agric Food Chem*, 61(51), 12473-12491pp.
- Götz C., Fekete A., Gebefuegi I., Forczek S. T., Fuksova K., Li X.**, 2007, Uptake, degradation and chiral discrimination of N-acyl-D/L-homoserine lactones by barley (*Hordeum vulgare*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 1447–1457pp
- Götz-Rösch, C., Sieper, T., Fekete, A., Schmitt-Kopplin, P., Hartmann, A., and Schroder, P.**, 2015, Influence of bacterial N-acyl-homoserine lactones on growth parameters, pigments, antioxidative capacities and the xenobiotic phase II detoxification enzymes in barley and yam bean, *J Biol Chem*;288(33):23914-27p
- Graham, J., Hackett, C. A., Smith, K., Woodhead, M., MacKenzie, K., Tierney, I., Cooke, D., Bayer, M., and Jennings, N.**, 2011, Towards an understanding of the nature of resistance to *Phytophthora* root rot in red raspberry, *Theor Appl Genet*, 123(4), 585-601pp.
- Graham, M. Y., Weidner, J., Wheeler, K., Pelow, M. J., and Graham, T. L.**, 2003, Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63(3), 141-149pp.
- Grant, J. J., and Loake, G. J.**, 2000, Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance, *Plant Physiol*, 124(1), 21-29pp.
- Gray, K. M., and Garey, J. R.**, 2001, The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators, *Microbiology*, 147(Pt 8), 2379-2387pp.
- Hamm, H. E.**, 1998, The many faces of G protein signaling, *J Biol Chem*, 273(2), 669-672pp.
- Hammerschmidt, R.**, 1999, Phytoalexins: What have we learned after 60 years?, *Annu Rev Phytopathol*, 37, 285-306pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hammerschmidt, R.**, 2007, Introduction: Definitions and Some History, 1-9, Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection (Eds. D. Walters, A. Newton & G. D. Lyon). Blackwell Publishing, UK, 258 pp.
- Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D.**, 1996, Resistance gene-dependent plant defense responses, *Plant Cell*, 8(10), 1773-1791pp.
- Han, Y., Chen, F., Li, N., Zhu, B., and Li, X.**, 2010, *Bacillus marcorestinum* sp. nov., a novel soil acylhomoserine lactone quorum-sensing signal quenching bacterium, *Int J Mol Sci*, 11(2), 507-520pp.
- Hartmann, A., Gantner, S., Schuhegger, R., Steidle, A., Dürr, C., Schmid, M., Dazzo, F., Eberl, L., and Langenbartels, C.**, 2004, N-Acyl-homoserine lactones of rhizosphere bacteria trigger systemic resistance in tomato plants. In (Vol. Vol. 4, pp. 554-556).
- Hartmann, A., Rothballer, M., Hense, B. A., and Schröder, P.**, 2014, Bacterial quorum sensing compounds are important modulators of microbe-plant interactions, (1664-462X (Print)).
- Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D.**, 2009, Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Mol Plant Microbe Interact*, 22(5), 529-537pp.
- Hausbeck MK., Linderman SD.**, 2014 Evaluation of fungicides for control of downy mildew of cucumber, *Plant Dis Management Rep* 8: V304
- Heaney, S. P., Hall, A. A., Davies, S. A., and Olaya, G.**, 2000., *Resistance to fungicides in the Qol-STAR cross-resistance group: current perspectives*. Farnham.
- Heath, M. C.**, 2000, Hypersensitive response-related death, *Plant Mol Biol*, 44(3), 321-334pp.
- Heinrich, M., Baldwin, I. T., and Wu, J.**, 2011, Two mitogen-activated protein kinase kinases, MKK1 and MEK2, are involved in wounding- and specialist lepidopteran herbivore *Manduca sexta*-induced responses in *Nicotiana attenuata*, *J Exp Bot*, 62(12), 4355-4365pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Helman, Y., and Chernin, L.,** 2015, Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease, *Mol Plant Pathol*, 16(3), 316-329pp.
- Hematy, K., Cherk, C., and Somerville, S.,** 2009, Host-pathogen warfare at the plant cell wall, *Curr Opin Plant Biol*, 12(4), 406-413pp.
- Hense, B. A and Schuster, M.,** 2015, Core principles of bacterial autoinducer systems, *Microbiol Mol Biol Rev.*, 9(1):153-69 (1098-5557pp)
- Hernandez-Reyes, C., Schenk, S. T., Neumann, C., Kogel, K. H., and Schikora, A.,** 2014, N-acyl-homoserine lactones-producing bacteria protect plants against plant and human pathogens, *Microb Biotechnol*, 7(6), 580-588pp.
- Herzog V, and Fahimi H.,** 1973, Determination of the activity of peroxidase. *Analytical Biochemistry*, 55, 554–562.
- Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y.,** 2008, Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*, *Mol Genet Genomics*, 279(3), 303-312pp.
- Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Baurle, I., Geiselhardt, S., Hinch, D. K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M. C., Rolff, J., Romeis, T., Schmulling, T., Steppuhn, A., van Dongen, J., Whitcomb, S. J., Wurst, S., Zuther, E., and Kopka, J.,** 2016, Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system, *Biol Rev Camb Philos Soc*, 91(4), 1118-1133pp.
- Hogenhout, S. A., and Loria, R.,** 2008, Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria, *Curr Opin Plant Biol*, 11(4), 449-456pp.
- Holeski, L. M., Jander G Fau - Agrawal, A. A., and Agrawal, A. A.,** 2012, Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants, *Trends Ecol Evol*, 27(11):618-26pp
- Holmes, G. J., Main, C. E., and Kever, Z. T.,** 2004,. Cucurbit Downy Mildew: A Unique Pathosystem for Disease Forecasting. In P. Spencer-Phillips & M. Jeger (Eds.), *Advances in Downy Mildew Research — Volume 2* (pp. 69-80). Dordrecht: Springer Netherlands.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Holmes, G.J. and Thomas, C.E.**, 2006, The history and re-emergence of cucurbit downy mildew (Abstr.). *Phytopathology*, 99 (suppl.), S171.
- Hu, P., Zhou, W., Cheng, Z., Fan, M., Wang, L., and Xie, D.**, 2013, JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense, *Mol Cell*, 50(4), 504-515pp.
- Hübschová, J., and Lebeda, A.**, 2010,. Fungicide effectiveness on Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis* , *Acta horticulturae* 871(871):458-464pp
- Huckelhoven, R.**, 2007, Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility, *Annu Rev Phytopathol*, 45, 101-127pp.
- Huckelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., and Kogel, K.-H.**, 1999, Hypersensitive Cell Death and Papilla Formation in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus Are Associated with Hydrogen Peroxide but Not with Salicylic Acid Accumulation, *Plant Physiology*, 119(4), 1251-1260pp.
- Hughes, D. T., and Sperandio, V.**, 2008, Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts, *Nat Rev Microbiol*, 6(2):111-20pp.
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H. J., Yu, J., Nam, S. J., Ko, J., Park, J. Y., Seo, Y. S., Kim, E. Y., Ryu, S. B., Kim, W. T., Lee, Y. H., Kang, H., and Lee, I.**, 2008, Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis, *Dev Cell*, 14(2), 183-192pp.
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., and Hollomon, D. W.**, 2001, Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew, *Phytopathology*, 91(12), 1166-1171pp.
- Jabs, T., Dietrich, R. A., and Dangel, J. L.**, 1996, Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide, *Science*, 273(5283), 1853-1856pp.
- Jacobs, A. K., Lipka, V., Burton, R. A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., and Fincher, G. B.**, 2003, An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation, *Plant Cell*, 15(11), 2503-2513pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jakubczyk, D., Barth, C., Kubas, A., Anastassacos, F., Koelsch, P., Fink, K., Schepers, U., Brenner-Weiss, G., and Brase, S., 2012,** Deuterium-labelled N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs)--inter-kingdom signalling molecules--synthesis, structural studies, and interactions with model lipid membranes, *Anal Bioanal Chem*, 403(2), 473-482pp.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M. R., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J. T., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R., and Becker, D., 2010,** Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels, *Plant J*, 62(3), 367-378pp.
- Jia, Z., Zou, B., Wang, X., Qiu, J., Ma, H., Gou, Z., Song, S., and Dong, H., 2010,** Quercetin-induced H₂O₂ mediates the pathogen resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis thaliana*, *Biochem Biophys Res Commun*, 396(2), 522-527pp.
- Jin, P., Zheng, Y., Tang, S., Rui, H., and Wang, C. Y., 2009,** Enhancing disease resistance in peach fruit with methyl jasmonate, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(5), 802-808pp.
- Joint, I., Tait K Fau - Wheeler, G., and Wheeler, G., 2007,** Cross-kingdom signalling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 29; 362(1483): 1223–1233pp.
- Jones, J. D., and Dangl, J. L., 2006,** The plant immune system, *Nature*, 444(7117), 323-329pp.
- Joo, J. H., Bae Ys Fau - Lee, J. S., and Lee, J. S., 2001,** Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism, *Plant Physiol*, 126(3): 1055–1060.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J. T., 2009,** Priming in systemic plant immunity, *Science*, 324(5923), 89-91pp.
- Kaling, M., Schmidt, A., Moritz, F., Rosenkranz, M., Witting, M., Kasper, K., Janz, D., Schmitt-Kopplin, P., Schnitzler, J. P., and Polle, A., 2018,** Mycorrhiza-Triggered Transcriptomic and Metabolomic Networks Impinge on Herbivore Fitness, *Plant Physiol*, 176(4), 2639-2656pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaplan H.B. and Greenberg, E. P.**, 1985, Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system, *Journal of Bacteriology*, 163(3): 1210–1214 (0021-9193pp).
- Karlsson, T., Turkina, M. V., Yakymenko, O., Magnusson, K. E., and Vikstrom, E.**, 2012, The *Pseudomonas aeruginosa* N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration, *PLoS Pathog.* 8(10), e1002953p.
- Ke, X., Miller, L. C., and Bassler, B. L.**, 2015, Determinants governing ligand specificity of the *Vibrio harveyi* LuxN quorum-sensing receptor, *Molecular Microbiology*, 95(1), 127-142pp.
- Kim, D. S., and Hwang, B. K.**, 2014, An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens, *J Exp Bot*, 65(9), 2295-2306pp.
- Kim, J., and Felton, G. W.**, 2013, Priming of antiherbivore defensive responses in plants, *Insect Science*, 20(3):273-85. (1744-7917pp).
- Kim, K. C., Lai, Z., Fan, B., and Chen, Z.**, 2008, Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense, *Plant Cell*, 20(9), 2357-2371pp.
- Kloth, K. J., Wieggers, G. L., Busscher-Lange, J., van Haarst, J. C., Kruijer, W., Bouwmeester, H. J., Dicke, M., and Jongsma, M. A.**, 2016, AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling, *J Exp Bot*, 67(11), 3383-3396pp.
- Knoth, C., Ringler, J., Dangel, J. L., and Eulgem, T.**, 2007, Arabidopsis WRKY70 is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*, *Mol Plant Microbe Interact*, 20(2), 120-128pp.
- Koen E, Trapet P, Brulé D, Kulik A, Klinguer A, Atauri-Miranda L, Meunier-Prest R, Boni G, Glauser G, Mauch-Mani B, Wendehenne D, Besson-Bard A.**, 2014, β -Aminobutyric acid (BABA)-induced resistance in *Arabidopsis thaliana*: link with iron homeostasis. *Mol Plant Microbe Interact.* 27(11):1226-40p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kohler, A., Schwindling, S., and Conrath, U.,** 2002, Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 128(3), 1046-1056pp.
- Kollist, H., Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Nuhkat, M., Kangasjarvi, J., and Mittler, R.,** 2018, Rapid Responses to Abiotic Stress: Priming the Landscape for the Signal Transduction Network, *Trends Plant Science*, 24(1):25-37.
- Koornneef, A., and Pieterse, C. M.,** 2008, Cross talk in defense signaling, *Plant Physiol*, 146(3), 839-844pp.
- Korbel, E.,** 1990, Možnost použití biologické ochrany proti plísni okurkové (Possibility of biological control utilisation against cucurbit downy mildew). In A. Lebeda (Ed.), Plíseň okurková (Cucurbit downy mildew) (pp. 62–64). Praha, Czechoslovakia: Československá vědecká společnost promykologii při ČSAV (Czechoslovak Scientific Society for Mycology by Czechoslovak Academy of Sciences).
- Kumar, S., Kolodkin-Gal I Fau - Engelberg-Kulka, H., and Engelberg-Kulka, H.,** 2013, Novel quorum-sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death, *mBio*, 4(3): e00314-13.p.
- Lagace, M., and Matton, D. P.,** 2004, Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*, *Planta*, 219(1), 185-189pp.
- Lahaye, T.,** 2002, The *Arabidopsis* RRS1-R disease resistance gene--uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense?, *Trends Plant Sci*, 7(10), 425-427pp.
- Lamb, C., and Dixon, R. A.,** 1997, The oxidative burst in plant disease resistance, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 251-275pp.
- Lanteri, M. L., Laxalt, A. M., and Lamattina, L.,** 2008, Nitric Oxide Triggers Phosphatidic Acid Accumulation via Phospholipase D during Auxin-Induced Adventitious Root Formation in Cucumber, *Plant Physiology*, 147(1), 188-198pp.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M. B.,**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Offringa, R., Graham, N., Dumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T., and Bennett, M.**, 2007, Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation, *The Plant Cell*, 19(12), 3889-3900pp.
- Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F., and Williams, P.**, 2000, The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the Rhizobium small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase, *Microbiology*, 146 (Pt 10), 2469-2480pp.
- Leadbetter, J. R., and Greenberg, E. P.**, 2000, Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*, *J Bacteriol*, 182(24), 6921-6926pp.
- Lebeda, A., and Schwinn, F. J.**, 1994, The downy mildews – an overview of recent research progress / Falscher Mehltau – Übersicht über neuere Forschungsergebnisse, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 101(3), 225-254pp.
- Li, J., Brader, G., and Palva, E. T.**, 2004, The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense, *The Plant Cell*, 16(2), 319-331pp.
- Li, J., Wang, J., Wang, N., Guo, X., and Gao, Z.**, 2015, GhWRKY44, a WRKY transcription factor of cotton, mediates defense responses to pathogen infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121(1), 127-140pp.
- Lindenthal, M., Steiner, U., Dehne, H. W., and Oerke, E. C.**, 2005, Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography, *Phytopathology*, 95(3), 233-240pp.
- Liu, F., Bian Z Fau - Jia, Z., Jia Z Fau - Zhao, Q., Zhao Q Fau - Song, S., and Song, S.**, 2012, The GCR1 and GPA1 participate in promotion of Arabidopsis primary root elongation induced by N-acyl-homoserine lactones, the bacterial quorum-sensing signals, *Mol Plant Microbe Interact*, 25(5):677-83p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, H., Coulthurst, S., Pritchard, L., E Hedley, P., Ravensdale, M., Humphris, S., Burr, T., Takle, G., Brurberg, M., R J Birch, P., P C Salmond, G., and Toth, I.** ,2008, Quorum Sensing Coordinates Brute Force and Stealth Modes of Infection in the Plant Pathogen *Pectobacterium atrosepticum*, *PLoS Pathogens*,4(6):e1000093.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D.**, 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25(4), 402-408pp.
- Lopez, M. A., Bannenberg, G., and Castresana, C.**, 2008, Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival, *Curr Opin Plant Biol*, 11(4), 420-427pp.
- Lowery, C. A., Dickerson Tj Fau - Janda, K. D., and Janda, K. D.**, 2008, Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing,, *Chem Soc Rev*, 37(7):1337-46p
- Luan, Q., Chen, C., Liu, M., Li, Q., Wang, L., and Ren, Z.**, 2019, CsWRKY50 mediates defense responses to *Pseudoperonospora cubensis* infection in *Cucumis sativus*, *Plant Sci*, 279, 59-69pp.
- Lukatkin, A.**,2003, Contribution of Oxidative Stress to the Development of Cold-Induced Damage to Leaves of Chilling-Sensitive Plants: 3. Injury of Cell Membranes by Chilling Temperatures, *Russian Journal of Plant Physiology*, Volume 50, Issue 2, pp 243–246pp
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J.**, 2011, Callose deposition: a multifaceted plant defense response, *Mol Plant Microbe Interact*, 24(2), 183-193pp.
- Madhava R.and Sresty, T.**, 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157: 113-128.
- Malamy, J. N. Y. U., Sanchez-Casas, P., Hennig, J., Guo, A., and Klessig, D. F.**, 1996, Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco *AGRIS*, v. 9, 474-482pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Marhavy, P., Bielach A Fau - Abas, L., Abas L Fau - Abuzeineh, A., Abuzeineh A Fau - Duclercq, J., Duclercq J Fau - Tanaka, H., Tanaka H Fau - Parezova, M., Parezova M Fau - Petrasek, J., Petrasek J Fau - Friml, J., Friml J Fau - Kleine-Vehn, J., Kleine-Vehn J Fau - Benkova, E., and Benkova, E.,**2011, Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis, *Dev Cell*,18;21(4):796-804pp
- Marhavy, P., Duclercq, J., Weller, B., Feraru, E., Bielach, A., Offringa, R., Friml, J., Schwechheimer, C., Murphy, A., and Benkova, E.,** 2014, Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis, *Curr Biol*,24(9):1031-7p
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., and Pauly, N.,** 2012, A burst of plant NADPH oxidases, *Trends Plant Sci*, 17(1), 9-15pp.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M. J., Pozo, M. J., Ton, J., van Dam, N. M., and Conrath, U.,** 2016, Recognizing Plant Defense Priming, *Trends Plant Sci*, 21(10), 818-822pp.
- Mashburn, L. M., and Whiteley, M.,** 2005, Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote, *Nature*,437(7057):422-5 p.
- Mason, M. G., and Botella, J. R.,** 2000, Completing the heterotrimer: isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* G protein gamma-subunit cDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14784-14788pp.
- Mathesius, U., Mulders S Fau - Gao, M., Gao M Fau - Teplitski, M., Teplitski M Fau - Caetano-Anolles, G., Caetano-Anolles G Fau - Rolfe, B. G., Rolfe Bg Fau - Bauer, W. D., and Bauer, W. D.,** 2003, Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals, *PNAS*, 2003 100 (3) 1444-1449pp.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., and Flors, V.,**2017, Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance, *Annual Review of Plant Biology*, 28;68:485-512.pp
- McConn, M., and Browse, J.,** 1996, The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant, *Plant Cell*, 8(3), 403-416pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McDougald, D., Rice, S. A., and Kjelleberg, S.,** 2007, Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics, *Anal Bioanal Chem*, 387(2), 445-453pp.
- Mei, G. Y., Yan, X. X., Turak, A., Luo, Z. Q., and Zhang, L. Q.,** 2010, AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase, *Appl Environ Microbiol*, 76(15), 4933-4942pp.
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., and He, S. Y.,** 2017, Stomatal Defense a Decade Later, *Plant Physiology*, 174(2), 561-571pp.
- Mendez-Bravo, A., Raya-Gonzalez J Fau - Herrera-Estrella, L., Herrera-Estrella L Fau - Lopez-Bucio, J., and Lopez-Bucio, J.,** 2010; Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.*, 51(10):1612-26p
- Mhlongo, M. I., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., Madala, N. E., and Dubery, I. A.,** 2016, Profiling of altered metabolomic states in *Nicotiana tabacum* cells Induced by priming agents, *Front Plant Sci*, 7, 1527pp.
- Michelmore, R. W.,** 1981, Sexual and asexual sporulation in the downy mildews. In D. M. Spencer (Ed.), *The downy mildews*, pp. 165–181, London: Academic.
- Midoh, N.,** 1996, Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice, *Plant & cell physiology*, v. 37(no. 1), pp. 9-18-1996 v.1937 no.1991pp.
- Milton, D. L., Chalker, V. J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M., and Williams, P.,** 2001, The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3 hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone, *J Bacteriol*, 183(12), 3537-3547pp.
- Mitani S, Sugimoto K, Hayashi H, Takii Y, Ohshima T, and Matsuo N,** 2003, effects of cyazofamid against *Plasmodiophora brassicae* Woronin on chinese cabbage. *Pesticide Management Science*, 59, 287–93p.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F.,** 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci*, 9(10), 490-498pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Miura, K., and Tada, Y.**, 2014, Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid, *Front Plant Sci*, 5, 4pp.
- Moreira, S., Bishopp A Fau - Carvalho, H., Carvalho H Fau - Campilho, A., and Campilho, A.**, 2013, AHP6 inhibits cytokinin signaling to regulate the orientation of pericycle cell division during lateral root initiation, *PLoS One*, 8(2):e56370.
- Morquecho-Contreras, A., Méndez-Bravo A Fau - Pelagio-Flores, R., Pelagio-Flores R Fau - Raya-González, J., Raya-González J Fau - Ortiz-Castro, R., Ortiz-Castro R Fau - López-Bucio, J., and López-Bucio, J.**, 2010, Characterization of *dr1*, an alkamide-resistant mutant of *Arabidopsis*, reveals an important role for small lipid amides in lateral root development and plant senescence *Plant Physiol*, 152(3):1659-73
- Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E., and Zenk, M. H.**, 1993, Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16), 7490-7494pp.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J., and Berger, S.**, 2008, General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 20: 768–785.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Liu, Y., and Chatterjee, A. K.**, 1997, Molecular characterization and expression of the *Erwinia carotovora* *hrpNEcc* gene, which encodes an elicitor of the hypersensitive reaction, *Mol Plant Microbe Interact*, 10(4), 462-471pp.
- Murashige T. and Skoog F.**, 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *physiologia plantarum* vol. 15
- Navarova, H., Bernsdorff, F., Doring, A. C., and Zeier, J.**, 2012, Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity, *Plant Cell*, 24(12), 5123-5141pp.
- Nealson Kh Fau - Platt, T., Platt T Fau - Hastings, J. W., and Hastings, J. W.**, 1970, Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system, *Journal of Bacteriology*, 104(1):313-22.pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Neill, S., Desikan, R., and Hancock, J., 2002, Hydrogen peroxide signalling, *Curr Opin Plant Biol*, 5(5), 388-395pp.
- Ng, W. L., and Bassler, B. L., 2009, Bacterial quorum-sensing network architectures, *Annual Review Genetics*, 43:197-222.pp.
- Oerke, E. C., Steiner, U., Dehne, H. W., and Lindenthal, M., 2006, Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions, *J Exp Bot*, 57(9), 2121-2132pp.
- Okamoto, H., Matsui, M., and Deng, X. W., 2001, Overexpression of the Heterotrimeric G-Protein α -Subunit Enhances Phytochrome-Mediated Inhibition of Hypocotyl Elongation in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 13(7), 1639-1652pp.
- Olatunji, D., Geelen, D. A.-O., and Verstraeten, I., 2017, Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development., *Int J Mol Sci*, 18(12p)
- Ortiz-Castro, R., Martinez-Trujillo M Fau - Lopez-Bucio, J., and Lopez-Bucio, J., 2008, N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in Arabidopsis thaliana, *Plant Cell Environ*, (10):1497-509.pp
- Overvoorde, P., Fukaki H Fau - Beeckman, T., and Beeckman, T., 2010, Auxin control of root development, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(6).
- Pagnussat, G. C., Lanteri Ml Fau - Lamattina, L., and Lamattina, L., 2003, Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process *Plant Physiol*, 132(3):1241-8.
- Pajerowska-Mukhtar, K. M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C. L., Fonseca, J. P., and Dong, X., 2012, The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition, *Curr Biol*, 22(2), 103-112pp.
- Palmer, A. G., Senechal Ac Fau - Mukherjee, A., Mukherjee A Fau - Ané, J.-M., Ané Jm Fau - Blackwell, H. E., and Blackwell, H. E., 2014, Plant responses to bacterial N-acyl L-homoserine lactones are dependent on enzymatic degradation to L-homoserine, *ACS Chem Biol*, 15;9(8):1834-45

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Palti, J., and Cohen, Y.,** 1980,. Downy mildew of Cucurbits (*Pseudoperonospora Cubensis*): the Fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control, *Phytoparasitica*, 8(2):109-147pp
- Pang Y., Liu X., Ma Y., Chernin L., Berg G., and Gao K.,** 2009, Induction of systemic resistance, root colonisation and biocontrol activities of the rhizospheric strain of *Serratia plymuthica* are dependent on N-acyl homoserine lactones., *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 261–268pp
- Papavizas, G.C.,**1964, New medium for the isolation of *Thielaviopsis basicola* on dilution plates from soil and rhizosphere. *Phytopathology* 54, 1475.
- Papenfort, K., and Bassler, B. L.,** 2016, Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria, *Nat Rev Microbiol*, 14(9), 576-588pp.
- Parages, M. L., Heinrich, S., Wiencke, C., and Jiménez, C.,** 2013, Rapid phosphorylation of MAP kinase-like proteins in two species of Arctic kelps in response to temperature and UV radiation stress, *Environmental and Experimental Botany*, 91, 30-37pp.
- Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y., and Lee, J. K.,** 2003, AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria, *Microbiology*, 149(Pt 6), 1541-1550pp.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr., and Greenberg, E. P.,** 1999, Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8), 4360-4365pp.
- Pastor, V., Balmer, A., Gamir, J., Flors, V., and Mauch-Mani, B.,** 2014, Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds, *Front Plant Sci*, 5, 295p.
- Pastor, V., Luna, E., Ton, J., Cerezo, M., Garcia-Agustin, P., and Flors, V.,** 2013, Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in *Arabidopsis*, *Mol Plant Microbe Interact*, 26(11), 1334-1344pp.
- Pavelková, J., Lebeda, A., and Sedláková, B.,** 2014, Efficacy of fosetyl-Al, propamocarb, dimethomorph, cymoxanil, metalaxyl and metalaxyl-M in Czech *Pseudoperonospora cubensis* populations during the years 2005 through 2010, *Crop Protection*, 60, 9-19pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pellegrini, L., Rohfritsch, O., Fritig, B., and Legrand, M.,** 1994, Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor, *Plant Physiol*, 106(3), 877-886pp.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharma, S. B., Klessig, D. F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B., and Mundy, J.,** 2000, Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance, *Cell*, 103(7), 1111-1120pp.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., and Bakker, P. A.,** 2014, Induced systemic resistance by beneficial microbes, *Annu Rev Phytopathol*, 52, 347-375pp.
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H.,** 2009, MAPK cascade signalling networks in plant defence, *Curr Opin Plant Biol*, 12(4), 421-426pp.
- Portz, D., Koch, E., and Slusarenko, A. J.,** 2008, Effects of garlic (*Allium sativum*) juice containing allicin on *Phytophthora infestans* and downy mildew of cucumber caused by *Pseudoperonospora cubensis*, v. 122.
- Qiu, J. L., Zhou, L., Yun, B. W., Nielsen, H. B., Fiil, B. K., Petersen, K., Mackinlay, J., Loake, G. J., Mundy, J., and Morris, P. C.,** 2008, Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1, *Plant Physiol*, 148(1), 212-222pp.
- Rankl, S., Gunse, B., Sieper, T., Schmid, C., Poschenrieder, C., and Schroder, P.,** 2016, Microbial homoserine lactones (AHLs) are effectors of root morphological changes in barley, *Plant Science*, 253:130-140 pp
- Rasmussen, T. B., Manefield, M., Andersen, J. B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., and Givskov, M.,** 2000, How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1, *Microbiology*, 146 Pt 12, 3237-3244pp.
- Reuveni, M.,** 1980,. Development of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis*, *Plant Disease*, 64(12):1108

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rivas, M., Seeger, M., Jedlicki, E., and Holmes, D. S.,** 2007, Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Appl Environ Microbiol*, 73(10), 3225-3231pp.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., and Shen, Q. J.,** 2010, WRKY transcription factors, *Trends Plant Sci*, 15(5), 247-258pp.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H. Y., Johnson, J., Delaney, T. P., Jesse, T., Vos, P., and Uknes, S.,** 1997, The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B, *Plant Cell*, 9(3), 425-439pp.
- Samuel, M. A., Miles, G. P., and Ellis, B. E.,** 2000, Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants, *Plant J*, 22(4), 367-376pp.
- Sang, M. K., Kim, E. N., Han, G. D., Kwack, M. S., Jeun, Y. C., and Kim, K. D.,** 2014, Priming-mediated systemic resistance in cucumber induced by *Pseudomonas azotoformans* GC-B19 and *Paenibacillus elgii* MM-B22 against *Colletotrichum orbiculare*, *Phytopathology*, 104(8), 834-842pp.
- Savvides, A., Ali, S., Tester, M., and Fotopoulos, V.,** 2016, Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible?, *Trends Plant Science*, 21(4):329-340pp.
- Scalschi, L., Vicedo, B., Camanes, G., Fernandez-Crespo, E., Lapena, L., Gonzalez-Bosch, C., and Garcia-Agustin, P.,** 2013, Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways, *Mol Plant Pathol*, 14(4), 342-355pp.
- Scarponi, L., Buonauro, R., and Martinetti, L.,** 2001, Persistence and translocation of a benzothiadiazole derivative in tomato plants in relation to systemic acquired resistance against *Pseudomonas syringae* pv tomato, *Pest Manag Sci*, 57(3), 262-268pp.
- Schenk, S. T., and Schikora, A.,** 2015a, Lignin Extraction and Quantification, a Tool to Monitor Defense Reaction at the Plant Cell Wall Level, *Bio-protocol*, 5(6), e1430pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schenk, S. T., Hernandez-Reyes, C., Samans, B., Stein, E., Neumann, C., Schikora, M., Reichelt, M., Mithofer, A., Becker, A., Kogel, K. H., and Schikora, A., 2014, N-Acyl-Homoserine Lactone Primes Plants for Cell Wall Reinforcement and Induces Resistance to Bacterial Pathogens via the Salicylic Acid/Oxylipin Pathway, *Plant Cell*;26(6):2708-2723pp**
- Schenk, S. T., Stein E Fau - Kogel, K.-H., Kogel Kh Fau - Schikora, A., and Schikora, A.,2012, Arabidopsis growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules, *Plant Signal Behaviour*. 2012 Feb;7(2):178-81pp).**
- Schenk, S., and Schikora, A. ,2015b,. AHL-Priming functions via oxylipin and salicylic acid *Frontiers in Plant Science* 14;5:784.p.**
- Schikora, A., Schenk St Fau - Stein, E., Stein E Fau - Molitor, A., Molitor A Fau - Zuccaro, A., Zuccaro A Fau - Kogel, K.-H., and Kogel, K. H., 2011, N-acyl-homoserine lactone confers resistance toward biotrophic and hemibiotrophic pathogens via altered activation of AtMPK6, *Plant Physiol.*, Nov;157(3):1407-18p**
- Schikora, A., Schenk, S. T., and Hartmann, A., 2016, Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group, *Plant Mol Biol*, 90(6), 605-612pp.**
- Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chetelat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U., and Weigel, D., 2008, Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets, *PLoS Biol*, 6(9), e230pp.**
- Schuhegger, R., Ihring A Fau - Gantner, S., Gantner S Fau - Bahnweg, G., Bahnweg G Fau - Knappe, C., Knappe C Fau - Vogg, G., Vogg G Fau - Hutzler, P., Hutzler P Fau - Schmid, M., Schmid M Fau - Van Breusegem, F., Van Breusegem F Fau - Eberl, L., Eberl L Fau - Hartmann, A., Hartmann A Fau - Langebartels, C., and Langebartels, C.,2006, Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria, *Plant Cell Environ.*, 29(5):909-18p**
- Schulze-Lefert, P., 2004, Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall, *Curr Opin Plant Biol*, 7(4), 377-383pp.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schuster A., and Schmoll M.**, 2009, Heterotrimeric G-protein signaling and light response: Two signaling pathways coordinated for optimal adjustment to nature, *Commun Integr Biol.*,2(4):308-10
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M., Cammue, B. P., and De Bolle, M. F.**, 2008, Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides, *Plant Physiol Biochem*, 46(11), 941-950pp.
- Shah, J.**, 2009, Plants under attack: systemic signals in defence, *Curr Opin Plant Biol*, 12(4), 459-464pp.
- Shah, J., Tsui, F., and Klessig, D. F.**, 1997, Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene, *Mol Plant Microbe Interact*, 10(1), 69-78pp.
- Sharif, D. I., Gallon J Fau - Smith, C. J., Smith Cj Fau - Dudley, E., and Dudley, E.**, 2008, Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium Gloeotheca PCC6909, *ISME J*, 2(12):1171-82p.
- Shi, C. L., Park, H. B., Lee, J. S., Ryu, S., and Ryu, C. M.**, 2010, Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90-166 is through both auxin-dependent and -independent signaling pathways, *Mol Cells*, 29(3), 251-258pp.
- Shi, Y., Zhang, Y., and Shih, D. S.**, 2006, Cloning and expression analysis of two beta-1,3-glucanase genes from strawberry, *J Plant Physiol*, 163(9), 956-967pp.
- Sieper, T., Forczek, S., Matucha, M., Kramer, P., Hartmann, A., and Schroder, P.**, 2014, N-acyl-homoserine lactone uptake and systemic transport in barley rest upon active parts of the plant, *New Phytol*, 201(2), 545-555pp.
- Sierotzki, H., Blum, M., Olaya, G., Waldner-Zulauf, M., Buitrago, C., Wullschleger, J., Cohen, Y., and Gisi, U.**, 2011, Sensitivity to CAA fungicides and frequency of mutations in cellulose synthase (CesA3) gene of oomycete pathogen populations, *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, VI. 151-154pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Simon-Plas, F., Elmayan, T., and Blein, J. P.**, 2002, The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells, *Plant J*, 31(2), 137-147pp.
- Sio, C. F., Otten, L. G., Cool, R. H., Diggle, S. P., Braun, P. G., Bos, R., Daykin, M., Cámara, M., Williams, P., and Quax, W. J.**, 2006, Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Infect Immun*, 74(3), 1673-1682pp.
- Skalický, V.**, 1961, Plíseň okurková–Peronoplasmopara cubensis. In J. Benada, & J. Špaček (Eds.) Zemědělská fytopatologie, díl III-Choroby zeleniny (Agricultural phytopathology, vol. III–diseases of vegetable crops), pp. 390–393, Praha, Czechoslovakia: Státní zemědělské nakladatelství
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., and Mauch-Mani, B.**, 2012, Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress, *Plant Physiol*, 158(2), 835-843pp.
- Song, G. C., Choi, H. K., and Ryu, C. M.**, 2013, The folate precursor para-aminobenzoic acid elicits induced resistance against Cucumber mosaic virus and *Xanthomonas axonopodis*, *Ann Bot*, 111(5), 925-934pp.
- Song, S., Jia, Z., Xu, J., Zhang, Z., and Bian, Z.**, 2011, N-butyryl-homoserine lactone, a bacterial quorum-sensing signaling molecule, induces intracellular calcium elevation in *Arabidopsis* root cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 414(2), 355-360pp.
- Spoel, S. H., and Dong, X.**, 2012, How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells, *ISME J*, 6(7):1336-44pp).
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Metraux, J. P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X., and Pieterse, C. M.**, 2003, NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol, *Plant Cell*, 15(3), 760-770pp.
- Stotz, H., Waller, F. and Wang, Y.**, 2013, Innate immunity in plants: the role of antimicrobial peptides. In: Antimicrobial Peptides and Innate Immunity (Hiemstra, Pieter S. and Zaat, Sebastian A.J. eds), pp. 29–51, Basel: Springer.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Suarez L., C., Fernandez R., R.,** 2010, Signalling pathway in plants affected by salinity and drought. *Itea-Inf Tec Econ Ag.* 106(3):157–169pp.
- Sun, C. H., Yu, J. Q., and Hu, D. G.,** 2017, Nitrate: A Crucial Signal during Lateral Roots Development, *Frontiers in Plant Science*, 4;8:485pp.
- Tabassum, T., Farooq, M., Ahmad, R., Zohaib, A., and Wahid, A.,** 2017, Seed priming and transgenerational drought memory improves tolerance against salt stress in bread wheat, *Plant Physiol Biochem*, 118, 362-369pp.
- Taheri, P., and Tarighi, S.,** 2010, Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway, *J Plant Physiol*, 167(3), 201-208pp.
- Takatsuka, H., and Umeda, M.,** 2014, Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots, *Journal of Experimental Botany*, 65(10):2633-43p
- Tang, W., Zhu, S., Li, L., Liu, D., and Irving, D. E.,** 2010, Differential expressions of PR1 and chitinase genes in harvested bananas during ripening, and in response to ethephon, benzothiadazole and methyl jasmonate, *Postharvest Biology and Technology*, 57(2), 86-91pp.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W. L., and Sheen, J.,** 2001, Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades, *Curr Opin Plant Biol*, 4(5), 392-400pp.
- Tenenboim, H., and Brotman, Y.,** 2016, Omic Relief for the Biotically Stressed: Metabolomics of Plant Biotic Interactions, *Trends Plant Sci*, 21(9), 781-791pp.
- Teplitski, M., Mathesius U Fau - Rumbaugh, K. P., and Rumbaugh, K. P.,** 2011, Perception and degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells, *Chem Rev*, 111(1):100-16 p
- Thaler, J. S., Humphrey Pt Fau - Whiteman, N. K., and Whiteman, N. K.,** 2012, Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk, *Trends in Plant Science*, 17(5):260-70pp.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., and Browse, J.,** 2007, JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling, *Nature*, 448(7154), 661-665pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thomas, C.E. and Jourdain, E.L.**, 1992, Host effect on selection of virulence factors affecting sporulation by *Pseudoperonospora cubensis*. *Plant Dis.* 76, 905–907
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., and Collinge, D. B.**, 1997, Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction, *The Plant Journal*, 11(6), 1187-1194pp.
- Tian, M., Win, J., Savory, E., Burkhardt, A., Held, M., Brandizzi, F., and Day, B.**, 2011, 454 Genome sequencing of *Pseudoperonospora cubensis* reveals effector proteins with a QXLR translocation motif, *Mol Plant Microbe Interact*, 24(5), 543-553pp.
- Tian, S., Wan Y Fau - Qin, G., Qin G Fau - Xu, Y., and Xu, Y.**, 2006, Induction of defense responses against Alternaria rot by different elicitors in harvested pear fruit, *Applied Microbiology Biotechnology*, 70(6):729-34p).
- Ton, J., and Mauch-Mani, B.**, 2004, Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose, *Plant J*, 38(1), 119-130pp.
- Ton, J., Jakab, G., Toquin, V., Flors, V., Iavicoli, A., Maeder, M. N., Metraux, J. P., and Mauch-Mani, B.**, 2005, Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis, *Plant Cell*, 17(3), 987-999pp.
- Torres, M. A., Dangl, J. L., and Jones, J. D.**, 2002, Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 517-522pp.
- Tsuda, K., and Katagiri, F.**, 2010, Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity, *Curr Opin Plant Biol*, 13(4), 459-465pp.
- Tun, N. N., Holk A Fau - Scherer, G. F., and Scherer, G. F.**, 2001, Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin, *FEBS Letter*. 2001 Dec 7;509(2):174-6.).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J.,** 1992, Acquired resistance in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 4(6), 645-656pp.
- Ullah, H., Chen, J. G., Temple, B., Boyes, D. C., Alonso, J. M., Davis, K. R., Ecker, J. R., and Jones, A. M.,** 2003, The beta-subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes, *Plant Cell*, 15(2), 393-409pp.
- Ullah, H., Chen, J. G., Wang, S., and Jones, A. M.,** 2002, Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination, *Plant Physiol*, 129(2), 897-907pp.
- Urban, J., and Lebeda, A.,** 2006, Fungicide resistance in cucurbit downy mildew – methodological, biological and population aspects, *Annals of Applied Biology*, 149(1), 63-75pp.
- Van der Ent S, Van Hulten M, Pozo MJ, Czechowski T, Udvardi MK, Pieterse CM, Ton J.,** 2009, Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and beta-aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytol* ,183: 419–431pp
- van der Luit, A. H., Olivari, C., Haley, A., Knight, M. R., and Trewavas, A. J.,** 1999, Distinct Calcium Signaling Pathways Regulate Calmodulin Gene Expression in Tobacco, *Plant Physiology*, 121(3), 705-714pp.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A., and Pieterse, C. M.,** 1998, Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria, *Annu Rev Phytopathol*, 36, 453-483pp.
- van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., and Conejero, V.,** 1994, Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins, *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245-264pp.
- Veliz-Vallejos, D. F., van Noorden, G. E., Yuan, M., and Mathesius, U.,** 2014, A Sinorhizobium meliloti-specific N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signal increases nodule numbers in *Medicago truncatula* independent of autoregulation, *Frontiers in Plant Science*, 14;5:551p

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vicedo, B., Flors, V., de la, O. L. M., Finiti, I., Kravchuk, Z., Real, M. D., Garcia-Agustin, P., and Gonzalez-Bosch, C., 2009, Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants, *Mol Plant Microbe Interact*, 22(11), 1455-1465pp.
- Vilchez, J. I., Niehaus, K., Dowling, D. N., Gonzalez-Lopez, J., and Manzanera, M., 2018, Protection of Pepper Plants from Drought by *Microbacterium* sp. 3J1 by Modulation of the Plant's Glutamine and alpha-ketoglutarate Content: A Comparative Metabolomics Approach, *Front Microbiol*, 9, 284pp.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., and Klessig, D. F., 2009, Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease, *Annu Rev Phytopathol*, 47, 177-206pp.
- Vlot, A. C., Klessig, D. F., and Park, S. W., 2008, Systemic acquired resistance: the elusive signal(s), *Curr Opin Plant Biol*, 11(4), 436-442pp.
- Voglmayr, H., 2008,. Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. In A. Lebeda, P. T. N. Spencer-Phillips, & B. M. Cooke (Eds.), *The Downy Mildews - Genetics, Molecular Biology and Control* (pp. 3-18). Dordrecht: Springer Netherlands.
- von Rad, U., Klein I Fau - Dobrev, P. I., Dobrev Pi Fau - Kottova, J., Kottova J Fau - Zazimalova, E., Zazimalova E Fau - Fekete, A., Fekete A Fau - Hartmann, A., Hartmann A Fau - Schmitt-Kopplin, P., Schmitt-Kopplin P Fau - Durner, J., and Durner, J., 2008, Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere, *Planta*, 229(1):73-85pp.
- Vorwerk, S., Somerville, S., and Somerville, C., 2004, The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance, *Trends Plant Sci*, 9(4), 203-209pp.
- Wang, B. L., Shi, L., Li, Y. X., and Zhang, W. H., 2010, Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings, *Planta*, 231(6), 1301-1309pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X.,** 2006, A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants, *PLoS Pathog*, 2(11), e123pp.
- Wang, W., Ben-Daniel, B. H., and Cohen, Y.,** 2004, Control of Plant Diseases by Extracts of *Inula viscosa*, *Phytopathology*, 94(10), 1042-1047pp.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Metraux, J. P., and Ryals, J. A.,** 1991, Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance, *Plant Cell*, 3(10), 1085-1094pp.
- Wasternack, C.,** 2007, Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development, *Ann Bot*, 100(4), 681-697pp.
- Waters, C. M., and Bassler, B. L.,** 2005, Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 319-346pp.
- Wathugala, D. L., Hemsley, P. A., Moffat, C. S., Cremelie, P., Knight, M. R., and Knight, H.,** 2012, The Mediator subunit SFR6/MED16 controls defence gene expression mediated by salicylic acid and jasmonate responsive pathways, *New Phytol*, 195(1), 217-230pp.
- Wei, G., and Shirsat, a. h.,** 2006, Extensin over-expression in Arabidopsis limits pathogen invasiveness, *Mol Plant Pathol*, 7(6), 579-592pp.
- Wessels, J. G. H., and Sietsma, J. H. ,**1981, Fungal Cell Walls: A Survey. In W. Tanner & F. A. Loewus (Eds.), *Plant Carbohydrates II: Extracellular Carbohydrates* (pp. 352-394). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., and Salmond, G. P.,** 2001, Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol Rev*, 25(4), 365-404pp.
- Williams, P.,** 2007, Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world, *Microbiology*, 153(Pt 12):3923-38p.
- Wolf, S., Hematy, K., and Hofte, H.,** 2012, Growth control and cell wall signaling in plants, *Annu Rev Plant Biol*, 63, 381-407pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., De Luca, V., and Despres, C.,** 2012, The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid, *Cell Rep*, 1(6), 639-647pp.
- Xavier, K. B., and Bassler, B. L.,** 2005, Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication, *Nature*, 437(7059): 750–753pp
- Xia X., J., Wang Y., J., Zhou Y., H., Tao Y., Mao W., H., Shi K., Asami T., Chen Z., X., and Yu J., Q.,** 2009, Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber, *Plant Physiology* 150, 801–814pp
- Xuan, W., Zhu, F. Y., Xu, S., Huang, B. K., Ling, T. F., Qi, J. Y., Ye, M. B., and Shen, W. B.,** 2008, The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process, *Plant Physiol*, 148(2), 881-893pp.
- Yang, C. W., Xu, H. H., Wang, L. L., Liu, J., Shi, D., and Wang, D. L.,** 2009,. Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants. *Photosynthetica*, Volume 47, Issue 1, 79–86pp
- Yang, C., Liang, Y., Qiu, D., Zeng, H., Yuan, J., and Yang, X.,** 2018, Lignin metabolism involves *Botrytis cinerea* BcGs1- induced defense response in tomato, *BMC Plant Biology*, 18(1), 103pp.
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H., and Williams, P.,** 2002, N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun*, 70(10), 5635-5646pp.
- Yi, S. Y., Min, S. R., and Kwon, S. Y.,** 2015, NPR1 is Instrumental in Priming for the Enhanced flg22-induced MPK3 and MPK6 Activation, *Plant Pathol J*, 31(2), 192-194pp.
- Zarkani, A. A., Stein, E., Röhrich, C. R., Schikora, M., Evguenieva-Hackenberg, E., Degenkolb, T., Vilcinskis, A., Klug, G., Kogel, K. H., and Schikora, A.,** 2013, Homoserine lactones influence the reaction of plants to rhizobia, *Int J Mol Sci*, 14(8), 17122-17146pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., and Bahadar, K.,** 2018, Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens, *Microbial Pathogenesis*, 124, 198-202pp.
- Zhang, C., Wang, J., Zhang, J., Hou, C., and Wang, G.,** 2011, Effects of β -aminobutyric acid on control of postharvest blue mould of apple fruit and its possible mechanisms of action, *Postharvest Biology and Technology*, 61(2-3), 145-151pp.
- Zhang, G., Zhang F Fau - Ding, G., Ding G Fau - Li, J., Li J Fau - Guo, X., Guo X Fau - Zhu, J., Zhu J Fau - Zhou, L., Zhou L Fau - Cai, S., Cai S Fau - Liu, X., Liu X Fau - Luo, Y., Luo Y Fau - Zhang, G., Zhang G Fau - Shi, W., Shi W Fau - Dong, X., and Dong, X.,** 2012, Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon, *ISME J.* 2012, 1336-44pp.
- Zhang, L. H., and Dong, Y. H.,** 2004, Quorum sensing and signal interference: diverse implications, *Mol Microbiol*, 53(6), 1563-1571pp.
- Zhang, S., Yang, X., Sun, M., Sun, F., Deng, S., and Dong, H.,** 2009, Riboflavin-induced priming for pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*, *J Integr Plant Biol*, 51(2), 167-174pp.
- Zhao, T., Rui, L., Li, J., Nishimura, M. T., Vogel, J. P., Liu, N., Liu, S., Zhao, Y., Dangel, J. L., and Tang, D.,** 2015, A truncated NLR protein, TIR-NBS2, is required for activated defense responses in the *exo70B1* mutant, *PLoS Genet*, 11(1), e1004945pp.
- Zhou, J., Sun, A., and Xing, D.,** 2013, Modulation of cellular redox status by thiamine-activated NADPH oxidase confers *Arabidopsis* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*, *J Exp Bot*, 64(11), 3261-3272pp.
- Zhu, X., Cao, J., Wang, Q., and Jiang, W.,** 2008, Postharvest Infiltration of BTH Reduces Infection of Mango Fruits (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) by *Colletotrichum gloeosporioides* and Enhances Resistance Inducing Compounds, *Journal of Phytopathology*, 156(2), 68-74pp.
- Zimmerli L, Jakab G, Métraux J-P, and Mauch-Mani B.,** 2000, Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:12920–12925

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zimmerli L, Métraux J-P, and Mauch-Mani, 2001,** B. β -aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*,126:517–523pp
- Zucker, M.,** 1965, Induction of Phenylalanine Deaminase by Light and its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potato Tuber Tissue, *Plant Physiol*, 40(5), 779-784pp.

TEŞEKKÜR

Bu doktora tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 217O420 no'lu araştırma projesi ile desteklenmiştir. Ayrıca tezin yürütücüsü TÜBİTAK tarafından yurt içi lisansüstü burs programı kapsamında yürütülmekte olan 2228-B yüksek lisans öğrencileri için yurt içi doktora burs programı ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Lisansüstü öğrenimim süresince destekleri ve danışmanlığı için Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nedim ÇETİNKAYA'ya tüm samimiyetimle teşekkür ederim. Bu tez kapsamında ikinci danışmanlık yaparak deneyimlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Melike BOR'a ve tez izleme komitemde yer alan diğer öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Çalışma süresinde yapılan analizlerin tasarlanmasında, yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde tecrübelerini ve emeğini benimle paylaşan eşim Burcu AZAK PAZARLAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince laboratuvar imkânlarını bana açan Sayın Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN'a, Sayın Prof. Dr. Enver DURMUŞOĞLU'na ve Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora süresi boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Utku Şanver'e, Arş. Gör. Rüştü Efe OKŞAR'a, Arş. Gör. Recep Serdar KARA'ya ve Arş. Gör. Gizem ÇİZMECİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Emek kavramı ve çalışma etiği konusunda bana her zaman yol gösterici olan aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İzmir'in Konak ilçesinde doğdu. Lise öğrenimini İzmir Fatma Saygın Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği programında lisans eğitime başladı. 2010 yılında Bitki koruma Bölüm eğitimine geçti ve 2012 yılında fakülte ve bölüm birincisi olarak lisans eğitimini tamamladı. 2014 yılı Şubat ayında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak işe başladı. 2015 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı ve Fitopatoloji anabilim dalında doktora başladı. Şu an hala aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

