

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. *TOMATO* İLE UYARILAN DOMATES
(*LYCOPERSICUM ESCULANTUM* MILL.) FİDELERİNDE SAVUNMAYLA
İLGİLİ BAZI MOLEKÜLER PARAMETRELERİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Harun ÖNLÜ
DANIŞMAN : Doç. Dr. İsmet BERBER

VAN-2009

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. *TOMATO* İLE UYARILAN DOMATES
(*LYCOPERSICUM ESCULANTUM* MILL.) FİDELERİNDE SAVUNMAYLA
İLGİLİ BAZI MOLEKÜLER PARAMETRELERİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Harun ÖNLÜ

VAN-2009

KABUL ve ONAY SAYFASI

Doç. Dr. İsmet BERBER danışmanlığında, Harun ÖNLÜ tarafından hazırlanan "*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ile Uyarılan Domates (*Lycopersicum esculantum* Mill.) Fidelcinde Savunmayla İlgili Bazı Moleküler Parametrelerin İncelenmesi" isimli bu çalışma 11/02/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Peyami BATTAL

İmza: 

Üye : Doç. Dr. İsmet BERBER

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Suat EKİN

İmza: 

Üye :

İmza:

Üye :

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 17./02./2009 gün ve 2009/111 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Yrd. Doç. Dr. Al. Sedat BEKİROĞLU
Enstitü Müdürü
Enstitü Müdürü

ÖZET

PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. *TOMATO* İLE UYARILAN DOMATES (*LYCOPERSICUM ESCULANTUM* MILL.) FİDELERİNDE SAVUNMAYLA İLGİLİ BAZI MOLEKÜLER PARAMETRELERİN İNCELENMESİ

ÖNLÜ, Harun

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İsmet BERBER

Şubat 2009, 64 sayfa

Pseudomonas syringae pv. *tomato* domates bitkisinde bakteriyel leke hastalığına sebep olan Gram-negatif bitki patojeni bir bakteridir. Bu çalışmada *P. syringae* pv *tomato* ile uyarılan domates fidelerinde Magnezyum (Mg) ve Mangan (Mn) elementleri, indol-3-asetik asit (IAA) ve absisik asit (ABA) bitki hormonları, maltoz ve fruktoz şekerleri, prolin, nitrit-nitrat, toplam klorofil-karetenoid seviyeleri ve savunma protein profilleri ve bu parametreler arasındaki olası ilişkiler incelenmiştir. İz element analizlerine göre, Mn elementinin seviyesi 0., 4. ve 10. günlerde (68.48 µg/ml, 46.25 µg/ml ve 32.69 µg/ml) hasta bitkilerde önemli oranda azalmıştır, kontrol grubunun 8. günü hariç bu oran benzerdir. Ayrıca Mg seviyesinde 10. günde (426.15 µg/ml) kontrol bitkisiyle kıyaslandığında hasta bitkilerde bir azalma mevcuttur.

Bulgularımız bakteri ile enfekte edilen domates bitkilerinde serbest L-prolin birikmesinin yükseldiğini göstermektedir. Patojen bulaştırılması ile kontrol grubuna kıyasla hasta domates bitkisinde nitrit içeriği 0. ve 1. günde yüksek olduğu halde, nitrat değerleri 0. ve 1. günde hasta bitkilerde düşük bulunmuştur. Nitrat değerlerinin hasta grupta 10. günde ölçülen 9.96 µg/ml değerine rağmen, nitrit değerleri aynı gün hasta bitkide 266.6 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Toplam hücre proteinlerinin SDS-poliakrilamid jel desenleri 69.9 kDa'luk proteinin hasta ve kontrol grubu domates bitkilerinde (2., 4., 8. ve 10. günlerde) önemli derecede arttığını görüldü. 54.3 kDa ağırlığındaki proteinin yalnızca 8. ve 10. günlerde kontrol hatlarda görülmüştür. Bulgularımız hasta bitkilerde 0. ve 2. günlerde absisik asit (ABA) seviyesinin kontrol grubu ile hasta bitkiler kıyaslandığında, diğer günler hariç, önemli oranda arttığını

ortaya koydu (yaklaşık olarak 0.144 g/ml ve 0.135 g/ml). Diğer taraftan, indol-3 asetik asit (IAA) ölçümü yapılan bütün günlerde kontrole hasta bitkiler kıyaslandığında hasta domates bitkilerinde önemli derecede (0.003-0.005 g/ml) azaldığı ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma, bakteriyal patojenlerin saldırılarına karşı bitki savunma mekanizmalarının düzenlenmesinde iz element, bitkisel hormon düzeyleri ve şeker içerikleri arasında karmaşık ilişkiler olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *P. syringae*, Mn, Mg, proline, nitrit-nitrat, PR-proteinleri, IAA, ABA ve şekerler.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF SOME MOLECULAR PARAMETERS RELATED TO DEFENSE IN TOMATO SEEDLINGS (*LYPERSICUM ESCULANTUM* MILL.) INFECTED BY *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TOMATO*

ÖNLÜ, Harun

MSc, Biological Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İsmet BERBER

February 2009, 64 pages

Pseudomonas syringae pv. *tomato* is a Gram-negative plant pathogenic bacterium caused by bacterial speck infection in tomato plant. In the present study were investigated the levels of trace element (Mn and Mg), phytohormone (IAA and ABA), sugar (maltose and fructose), proline, nitrite-nitrate, total chlorophyll-caretenoid and response protein profiles after inoculation with *P. syringae* pv. *tomato* in tomato seedlings and determined the possible relationships their among. According to the trace elements analysis, the level of Mn decreased significantly on 0., 4. and 10. days (68.48 µg/ml, 46.25 µg/ml and 32.69 µg/ml, respectively) in infected plants, comparing to control groups, except for 8. day. Moreover, there was the decrease at the level Mg level (426.15 µg/ml) for 10. day, comparing to control plants (414.57 µg/ml).

Our findings showed that accumulation of free L-proline rose continuously in tomato plants infected with virulent bacterium. Although nitrite contents were high on 0. and 1. days in tomato plants inoculated with the pathogen compared to uninfected groups, nitrate values were low in infected plants for 0. and 1. days. In contrary, despite the fact that nitrate value was measured for infected group as 9.96 µg/ml on 10., nitrite value was 266.6 µg/ml for same day in infected plants.

SDS-polyacrylamide gel patterns of whole-cell protein showed that a 69.9 kDa protein was significantly increased in the most cases (2., 4., 8., and 10. days) for infected and uninfected tomato plants. The protein weighing 54.3 kDa showed only on 4. and 8. days control lines. Our data revealed that the levels abscisic acid (ABA) raised

significantly on 0., and 2. days (0.144 g/ml and 0.135 g/ml, respectively) in infected plants, comparing to control groups, except for other cases. On the other hands, the measurements of indol-3-acetic acid (IAA) displayed that all cases there were significantly decreased infected tomato seedlings (among 0.003-0.005 g/ml), comparing to control groups (among 0.005-0.009 g/g).

Finally, the results of this study indicated that there are complex relationships among sugar contents, trace element and endogenous phytohormone levels in the regulation of defense mechanisms against attacks by bacterial pathogens.

Key words: *P. syringae*, Mn, Mg, proline, nitrite-nitrate, PR-proteins, IAA, ABA and sugars.

ÖN SÖZ

Türkiye’de tarım alanlarının geniş olması halkın gelir kaynakları arasında tarımsal üretimin önemini arttırmaktadır. Üretilen tarım ürünleri arasında sebzeler önemli yer tutmaktadır. Gelişen tarım araçları ve teknolojinin de katkısıyla günümüzde tarım çok kolaylaşmıştır. Bu gelişmeler ürün verimini ve kalitesini olumlu yönde arttırmaktadır. Fakat insanoğlunun tarımla uğraşmaya ve topraktan ürün elde etmeye başladığı ilk günden beri büyük kayıplara yol açan bitki hastalıkları tam olarak çözülemeyen bir sorundur. Bu hastalıklar kaliteyi ve verimi düşürmektedir. Bitki hastalıklarından kaynaklanan sorunu çözmek için farklı araştırmalar yapılmış, çözüm yolu olarak hastalıklara karşı dirençli türler üretilmesi ve biyolojik mücadele gibi yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca günümüzde bunlara ek olarak kullanılmakta olan ve çevreye büyük zarar veren kimyasal yöntemlerde uygulanmaktadır.

Ülkemizde yetiştirilen sebzeler içinde domates önemli bir yere sahiptir. Özellikle son yıllarda gelişen seracılık domates üretimini daha önemli ve verimli hale getirmiştir. Üretilen domatesin bir bölümü taze olarak tüketilirken, bir bölümü salça ve domates yan ürünlerinin yapımında kullanılmakta, bir bölümü de ihraç edilmektedir. Domates üretimine zarar veren önemli hastalıklardan biri domates bakteriyel leke hastalığıdır. Bu hastalık dünyanın birçok yerinde görülmekte ve önemli miktarda ürün kayıplarına sebep olmaktadır.

Bu çalışmayı bana yüksek lisans tez konusu olarak öneren, her aşamasında gerekli desteği ve yardımı sağlayan danışman hocam Doç. Dr. İsmet BERBER’e, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Peyami BATTAL’a, Yrd. Doç. Dr. Suat EKİN’e ve Arş. Gör. M. Emre EREZ’e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma ve Proje Başkanlığı (Proje No: 2008-FBE-YL009) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma ve Proje Başkanlığı’na teşekkürlerimi sunarım.

Harun ÖNLÜ

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
EKLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Domates bitkileri	12
3.1.2. Bakteri kültürü	12
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Domates bitkilerinin yetiştirilmesi	12
3.2.2. Bakterinin geliştirilmesi ve stok kültür hazırlanması	12
3.2.3. Aşılamanın yapılışı	13
3.2.4. Bitki örneklerinin alınması	13
3.2.5. Bitki örneklerinden proteinlerin ekstraksiyonu	14
3.2.5.1. SDS-PAGE Yapılışı	14
3.2.6. Hormonların ekstraksiyonu, saflaştırma ve analiz işlemleri	14
3.2.6.1. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri	14
3.2.6.2. Hormonların analizi	16
3.2.6.2.1. IAA ve ABA analizi	16
3.2.6.3. Şekerlerin analizi	17
3.2.6.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile analiz işlemleri	17
3.2.7. Toplam klorofil-karotenoid tayini	18

3.2.7.1. Toplam klorofil tayini	18
3.2.7.2. Toplam karetenoid tayini	19
3.2.8. Prolin seviyesinin belirlenmesi	19
3.2.9. İz element analizi	20
3.2.10. Nitrat-nitrit analizi	21
3.2.10.1. Nitrat analizi	21
3.2.10.1.1. Nitrat standardının hazırlanması	21
3.2.10.2. Nitrit analizi	22
3.2.10.2.1. Nitrit standardının hazırlanması	22
3.3. İstatistiksel analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerindeki Prolin Düzeylerine İlişkin Bulgular	24
4.2. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerindeki Toplam Klorofil-Toplam Karetenoid Miktarlarına İlişkin Bulgular	25
4.2.1. Toplam klorofil değerleri üzerindeki etki	25
4.2.2. Toplam karetenoid miktarı üzerindeki etki	26
4.3. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerindeki Nitrit-Nitrat Düzeylerine İlişkin Bulgular	27
4.3.1. Nitrit değerleri üzerine etki	27
4.3.2. Nitrat değerleri üzerine etki	28
4.4. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerindeki Magnezyum (Mg) ve Mangan (Mn) Düzeylerine İlişkin Bulgular	29
4.5. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerinin Protein Profillerine İlişkin Bulgular	31
4.6. Patojen İle Uyarılmış Domates Fidelerinin Şeker Düzeylerine İlişkin Bulgular	32
4.6.1. Patojen ile uyarılmış domates fidelerinin fruktoz düzeyleri	32
4.6.2. Patojen ile uyarılmış domates fidelerinin maltoz düzeyleri	33
4.7. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerinin Hormon Düzeylerine İlişkin Sonuçlar	34
4.7.1. IAA miktarı üzerine etki	34
4.7.2. ABA miktarı üzerine etkisi	35

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR	42
7. EKLER	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

	sayfa
Şekil 3.1. Domates fidelerinin hastalandırılmasına ilişkin fotoğraf	13
Şekil 3.2. Hormonlara ait HPLC kromatogramı	16
Şekil 3.3. Şekerlere ait HPLC kromatogramı	17
Şekil 3.4. Standart prolin miktarlarına ait absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisi	20
Şekil 3.5. Nitrat standart eğrisi	22
Şekil 3.6. Nitrit standart eğrisi	23
Şekil 4.1. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile aşılanan domates bitkilerindeki prolin düzeyleri	24
Şekil 4.2. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerindeki toplam klorofil düzeyleri	26
Şekil 4.3. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerindeki toplam karetenoid düzeyleri	27
Şekil 4.4. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerindeki nitrit düzeyleri	28
Şekil 4.5. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılan domates bitkilerindeki nitrat düzeyleri	29
Şekil 4.6. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılan domates bitkilerindeki Mg düzeyleri	30
Şekil 4.7. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılan domates bitkilerindeki Mn düzeyleri	31
Şekil 4.8. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış ve uyarılmamış domates fidelerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	32

Şekil 4.9. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılan domates bitkisindeki fruktoz düzeyleri	33
Şekil 4.10. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerindeki maltoz düzeyleri	34
Şekil 4.11. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerinin IAA düzeyleri	35
Şekil 4.12. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerinin ABA seviyeleri	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

	sayfa
Çizelge 4.1. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile aşılanan domates bitkilerindeki prolin düzeyleri	24
Çizelge 4.2. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerindeki toplam klorofil düzeyleri	25
Çizelge 4.3. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerindeki toplam karetenoid değerleri	26
Çizelge 4.4. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerindeki nitrit düzeyleri	28
Çizelge 4.5. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılan domates bitkilerindeki nitrat düzeyleri	29
Çizelge 4.6. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılan domates bitkilerindeki Mg ve Mn düzeyleri	30
Çizelge 4.7. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılan domates bitkisindeki fruktoz düzeyleri	33
Çizelge 4.8. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerindeki maltoz düzeyleri	34
Çizelge 4.9. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerinin IAA düzeyleri	35
Çizelge 4.10. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ile uyarılmış domates bitkilerinin ABA seviyeleri	36

EKLER DİZİNİ

	sayfa
Ek-1. Bakterinin Geliştirilmesinde Kullanılan Besi yeri	55
Ek-2. Poliakrilamid Jel Elektroforezde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	55
Ek-3. Prolin Analizinde Kullanılan Çözeltiler	58
Ek-4. Protein Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler	58
Ek-5. İz Element Tayininde Kullanılan Çözeltiler	60
Ek-6. Nitrit-Nitrat Tayininde Kullanılan Çözeltiler	60
Ek-7. Ekstraksiyon ve Saflaştırma İşleminde Kullanılan Çözeltiler	61
Ek-8. Hormonların Analizinde Kullanılan Çözeltiler	61
Ek-9. Şeker Analizinde Kullanılan Çözeltiler	62
Ek-10. Toplam Klorofil-Karotenoid Tayininde Kullanılan Çözeltiler	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

mM	Milimolar
μ l	Mikrolitre
Dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilo-dalton
L	Litre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
$^{\circ}$ C	Santigrad derece
Rpm	Rotary per minutes
μ	Mikron
μ m	Mikrometre
μ g	Mikrogram
nm	Nanometre
N	Normal
M	Molar
kg	Kilogram

Kısaltmalar

APS	Amonyum Per Sülfat
DSMZ	Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
HCl	Hidro Klorik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
Tris-HCl	Tris-HCl tamponu
UV	Ultraviyole
PVPP	Polivinilpoliprolidon

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
TEAA	Trietil Amonyum Asetat
Rs	Rezolüsyon
Klo-a	Klorofil-a
Klo-b	Klorofil-b
SEM	Ortalamanın standart hatası
SAR	Systemic Acquired Resistanca (İndüklenmiş sistemik direnç)
ABA	Absisik asit
JA	Jasmonik asit
SA	Salisilik asit
ET	Etilen
HR	Hipersensitive Response(Yüksek Duyarlı Yanıt)
INA	2,6-dikloroizonekotonik asit
BTH	Benzotiyadiyazol

1. GİRİŞ

Ülkemizde üretilen tarım ürünleri arasında sebzeler önemli yer tutmaktadır. Gelişen tarım araçları ve teknolojinin de katkısıyla günümüzde tarım çok kolaylaşmıştır. Bu gelişmeler ürün verimini ve kalitesini olumlu yönde arttırmaktadır. Fakat insanoğlunun tarımla uğraşmaya ve topraktan ürün elde etmeye başladığı ilk günden beri büyük kayıplara yol açan bitki hastalıkları tam olarak çözülemeyen bir sorundur. Bu hastalıklar kaliteyi ve verimi düşürmektedir. Bitki hastalıklarından kaynaklanan sorunu çözmek için farklı araştırmalar yapılmış, çözüm yolu olarak hastalıklara karşı dirençli türler üretilmesi ve biyolojik mücadele gibi yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca günümüzde bunlara ek olarak kullanılmakta olan ve çevreye büyük zarar veren kimyasal yöntemlerde uygulanmaktadır. Yetiştirilen sebzeler içinde domates önemli bir yere sahiptir. Özellikle son yıllarda gelişen seracılık domates üretimini daha önemli ve verimli hale getirmiştir. Üretilen domatesin bir bölümü taze olarak tüketilirken, bir bölümü salça ve domates yan ürünlerinin yapımında kullanılmakta, bir bölümü ise ihraç edilmektedir.

Domates, dünyada en çok üretilen, tüketilen ve ticarete konu olan tarım ürünlerinin başında gelmesi, insan beslenmesinde vazgeçilmez ürünlerden olması ve gıda sanayinde dondurulmuş, konserve, salça, ketçap, turşu gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olması nedeniyle önemli sebzelerin başında gelmektedir. Domates dünyada birçok ülkede yetiştirilmekle birlikte, Türkiye uygun iklim koşulları nedeniyle üretiminde önemli ülkelerden biridir. Gıda sanayi içinde en önemli hammaddelerden biri olan ve çok geniş bir kullanım alanı bulunan domates ile ilgili sanayi, meyve ve sebze işleme sanayi olmakla birlikte, bu sanayinin tüm alt dallarında da, domates hammadde olarak kullanılmaktadır. Bunlar; meyve ve sebze konserveleri sanayi, salça sanayi, meyve suyu sanayi, dondurulmuş meyve ve sebze sanayi, kurutulmuş sebze-meyve sanayi ve diğer sanayilerdir. Domates, Türkiye’de hem tarla sebzeciliğinde hem de örtü altı üretimde en fazla üretilen sebzelerin başında gelmektedir. Domates üretiminde bölgesel yoğunlaşmaya bağlı olarak, domates işleme sanayi de Marmara ve Ege Bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Akdeniz Bölgesi ise daha çok taze tüketime yönelik sera tipi üretiminde yoğunlaşmıştır. Türkiye’nin domates üretimi 1991 yılında 6.2 milyon tondan 2001 yılında 8.4 milyon tona ve 2002 yılında 9.5 milyon tona ulaşmıştır. Türkiye’de domates verimi dekara ortalama 4,000 kg civarındadır. Son yılların en düşük verimi 1997 yılında 3.518

kg, en yüksek verimi ise 2000 yılında 4.266 kg olarak gerçekleştirmiştir. Aynı yıllar arasında domates ihracatı üretime bağlı olarak artış göstermiş, bazı yıllarda ise ithalat yapılmıştır (Keskin ve Gül, 2004).

Bitkiler, patojen organizmaların bol olduğu ortamlarda yüz binlerce yıl var olmayı başarabilmek için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bitki ve patojenler arasındaki bazı etkileşimler “ gene karşı gen” direnç teorisi ile tanımlanan avirulent patojen ırklardaki özgül uyarıcı moleküllerin tanınmasına dayanır. Bir başka çeşit dayanıklılık, konak bitkide birden fazla geni ilgilendiren, çok daha az incelenmiş bir olaydır. Tüm bitkiler, çeşitli organizma veya kimyasal bileşiklerle ön-muamele edilmeleri durumunda indüklenen direnç mekanizmalarına sahiptirler. Bu genel dayanıklılık mekanizması indüklenmiş sistemik direnç (SAR: Systemic Acquired Resistance) veya bitki immünizasyonu olarak bilinir. ISR, en azından bazı bitki türlerinde, hidrolitik enzimler, peroksidazlar veya bitki savunmasında görevli diğer ürünler gibi birçok gen ürününün zamanla birikmesine bağlıdır. Bitkilerin indükleyici organizma veya kimyasal bileşiklerle ön muamelesi, patojenlerle daha sonraki karşılaşmalarında, uyumlu etkileşimi uyumsuz hale çevirerek, etkin bir savunma cevabı geliştirmesine yol açmaktadır (Tüzün, 2000).

Domates üretimine zarar veren önemli hastalıklardan biri domates bakteriyel leke hastalığıdır. Hastalığa sebep olan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hakkındaki ilk bilgiler 1933 yılında Okabe Alstatt tarafından tespit edilmiştir. Bu hastalık dünyanın birçok yerinde görülmekte ve önemli miktarda ürün kayıplarına sebep olmaktadır. Domates bakteriyel leke hastalığı, yaprak, sap, çiçek ve meyve saplarında kahverenginden siyaha kadar değişen renkte lekeler, meyvelerinde ise çapı 1 mm’den küçük yüzeysel lekeler meydana getirmektedir. Hastalığa sebep olan bakteri bitki kalıntıları üzerinde saprofit olarak 1-2 yıl yaşayabilmektedir. Patojen bitkiye girmek için doğal açıklıkları (stoma gibi) ya da yüzeyde oluşan yaraları kullanır. Bakteri enfeksiyon oluşturmak için yüksek sıcaklık ve neme ihtiyaç duyar. Patojenin konağı tanınması ve bağlanması ardından alınan başlangıç sinyalleri ile bakteri gelişmeye başlar ve bitkide hastalık oluşur. Enfeksiyon sırasında başlangıç sinyalleri konakçı bitki tarafından tespit edilir ve hastalıktan korunmak için savunma mekanizması uyarılır. Alınan sinyaller hastalıklara karşı sorumlu genleri aktive eder ve bitki dirençten sorumlu molekülleri sentezlenmeye başlar. Jasmonik asit (JA), salisilik asit (SA), etilen (ET) hastalıklara karşı dirençten sorumlu hormonlar arasında yer almaktadır (Feys ve Parker, 2000). Bu hormonların dirençteki fonksiyonlarının tam olarak anlaşılması ve onlarla birlikte savunma mekanizmasında görev alan diğer moleküllerin tespit edilmesi hastalıklara karşı

dirençli transgenik türlerin oluşturulmasında ve bitki hastalıkları ile mücadelede büyük bir önem teşkil etmektedir.

Bu çalışmada, Biotek Tohumculuğun Falcon tipi (*Lycopersicum esculantum* Mill.) domates tohumlarının çimlendirilmesi ile elde edilen domates fideleri Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Almanya) temin edilen *P. syringae* pv. *tomato* DSM 60407 suşu bakterisi ile enfekte edildi ve bir kontrol eşliğinde bitkide hastalığa karşı meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Hastalıktan sonra farklı zaman aralıklarında alınan bitki örneklerinden şeker, hormon, iz element, nitrit-nitrat, prolin, toplam klorofil ve karatenoid miktarları ve protein profilleri belirlenerek, hasta ve sağlam bitkiler arasındaki farklılıklar karşılaştırmalı olarak belirlendi. Şeker ve hormon seviyelerindeki değişiklikler yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı ile protein profilleri ise %12'lik Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrikamid Jel Elektrozef (SDS-PAGE) yöntemiyle, prolin, klorofil-karatenoid içeriği ve nitrit-nitrat analizleri spektrofotometrik olarak, iz element miktarları ise atomik adsorbsiyon cihazında ölçülerek hasta ve sağlam bitki arasındaki farklar ortaya konmuştur.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Bitkiler çevrelerindeki mikroorganizmalarla geniş bir etkileşim içindedir. Bu mikroorganizmaların bazıları patojenik ve hastalıklara sebep olurken bazıları bitki büyümesinin uyarılmasında yada doğal savunma mekanizmasının harekete geçirilmesinde faydalıdır (Pozo ve ark., 2005). Bitkiler çevrelerindeki herbivor ve patojenlere karşı daima meydan okurlar (Huang ve ark., 2003). Bitkiler, mikrobiyal patojenler ve herbivor böcekler gibi çok farklı saldırganlarla karşı karşıya gelirler. Kendilerini korumak ve potansiyel saldırıları önlemek için savunma stratejileri geliştirirler (Corne ve ark., 2001). Konukçu bitkiye patojenin bulaşmasının ardından hastalık yada direnç olmak üzere iki sonuç ortaya çıkar (Huang ve ark., 2003). *Pseudomonas syringae* çok geniş bir bitki grubunda yanıklık, yaprak lekeleri ve gallere neden olmaktadır. *P. syringae* pv. *atropurpurea*, *glycinea*, *maculicola*, *morsprunorum* ve *tomato* koronatin, *P. s.* pv. *persicae* persikomisin, *P. s.* pv. *phaseolicola* ve *P. s.* pv. *actinidae* faseolotoksin, *P. s.* pv. *syringae* siringomisin, siringotoksin ve siringostatin, *P. s.* pv. *atrofaciens* siringopeptin, *P. s.* pv. *tabaci*, *coronafaciens*, *garcae* tabtoxin ve *P. s.* pv. *tagetis* tagetitoksin toksinini üretmektedir (Bender, 1999; Barzic, 1999; Türkan ve Dolar, 2007). *P. syringae* pv. *tomato*, domateste bakteriyel leke hastalığına sebep olan ve meydana getirdiği ürün kayıpları nedeni ile önemli bir patojendir (İnceer, 1995). *P. syringae* bakterisi tip-III salgı sistemine sahiptir (Huang ve ark., 2003). *P. syringae* yapraklarda, köklerde, meyvelerde ve diğer bitki kısımlarında önemli hasarlara sebep olan geniş yayımlı bir patojendir. Bu bakteri birçok bitki türünün havayla temas halindeki yüzeylerinde geniş populasyonlar oluşturarak ciddi hastalıklara sebep olur. Bir çok prokaryotik ve ökaryotik hücre bu bakterinin bazı türleri tarafından üretilen siringomisin ve toksin türevlerine duyarlıdır (Bender ve ark., 1999). *P. syringae* pv. *tomato*'nun sebep olduğu hastalık, yaprak, sap, çiçek ve meyve saplarında kahverenginden siyaha kadar değişen renkte lekeler meyvelerde ise çapları 1 milimetreyi geçmeyen küçük yüzeysel siyah lekeler oluşturmaktadır. Yapraklar üzerindeki lekeler önceleri küçük, yuvarlak, suyu çekilmiş daha sonra kahverengi-siyahtır ve lekelerin etrafındaki doku giderek sararır (Cömert, 1994).

P. syringae pv. *tomato*, bitki yüzeyinde bulunan doğal açıklıklardan ya da yüzeyde bulunan yaralardan geçerek bitkiye nüfuz eder. Bakteri konağa temas ettikten sonra aldığı sinyallerle gelişmeye başlar ve hastalık uyarılır. Başlangıç sinyali konukçu tarafından alınırsa hastalıktan korunma mekanizması uyarılır (Cömert, 1994). Domates ve *P. syringae* arasındaki etkileşim tipik bir gen-gen etkileşimi olup patojenin avirülans (hrp) genleri ve bitkinin

dirençten sorumlu genleri tarafından yönetilir. Konukçu bitkinin yaprakları üzerinde *P. syringae*'ye karşı yüksek duyarlılıkta cevap (HR: Hypersensitive Response) başlar fakat bakteri tabakası hassas konukçuların nekrotik lezyonlarını işgal ederek bitkiyi hasta eder. Hastalık nekrotik beneklerin patojnin bulaştığı bölgelerin etrafında ortaya çıkması ile alakalıdır ve bu yüksel duyarlılıktaki cevap olarak ifade edilir. Bir HR reaksiyonuna, reaktif oksijen türlerinin ve antimikrobiyal bileşiklerin üretimi, hücre duvar proteinlerinin hızlı çapraz bağlanması, bazı savunma ile ilgili genlerin aktivasyonu ve son olarak patojene karşı direnç, çok yönlü savunma cevabı sonucu hücre ölümü eşlik eder (Huang ve ark., 2003). Bitkiler savunma mekanizmalarını harekete geçiren uyarıcıya göre farklı savunma yöntemlerine sahiptir. Bitkilerin doğal immün cevap kapasitesi farklı saldırganlara karşı oldukça karmaşık ve yüksek uygunlukta cevap verme yeteneğine sahiptir (Pozo ve ark., 2005). Bitki savunma sisteminin patojen saldırılara karşı göreve başlaması farklı sinyal şebekeleri tarafından düzenlenir (El-Khallal, 2007). Savunma sinyal yollarının şebekesinin düzenlenmesinde bitki hormonları salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve etilen'in (ET) baskın bir rol oynadığı saptanmıştır (Feys ve Parker, 2000). Bununla birlikte bitkilerin özel savunma cevapları içinden direnç sebep olan farklılıkları nasıl oluşturup sinyalleri tamamladığı hakkındaki bilgiler azdır. JA ve patojen arasındaki bağlantı *Arabidopsis* ve domatesin *P. syringae* toksini koronatin karşı verdikleri cevaplar çalışılarak saptanabilir. Koronatin bakteri tarafından üretilen, hasta bitkilerde bakteri gelişimi ve lezyon oluşumunda önemli derecede artan bir hastalık faktörüdür. Daha önceki çalışmalar koronatin'nin hastalık aktivitesinin bitkilerin savunma genlerini baskılaması ile ilgili olduğunu bildirir (Abramovitch ve Martin, 2004). Çok kabul gören bir hipoteze göre bu olay farklı sinyal yollarının modülasyonu ile başarılır (Corne ve ark., 2001). Koronatin, yapısal olarak etilen oluşumuna öncülük eden jasmonik asit ve aminosiklopropan karboksilik asite benzemektedir. Koronatin bitkilerde jasmonik asit ile aminosiklopropan karboksilik asit arasındaki benzerlikten dolayı etilen gibi hareket ederek hipertrofiye neden olmakta, kök gelişimini engellemekte ve etilen üretimini uyarmaktadır (Bender, 1999). Genellikle SA'ye bağlı savunma mikrobiyal patojenlere karşı cevapı harekete geçirirken, JA ve ET'ne bağlı savunma herbivor böceklere karşı yüksek kapsamlı savunma cevabını harekete geçirir (Bostock, 1999). SA, JA ve ET'ne bağlı sinyal yolları patojen saldırılara karşı bitki cevabını düzenler. SA'ye bağlı sinyaller savunmayı aktive eder, patojenle ilgili antimikrobiyal (PR) proteinlerin üretilmesi gibi, çeşitli mikrobiyal patojenlere karşı direnç oluşmasını sağlar (Abramovitch ve Martin, 2004). Bitkiler ve mikroorganizmalar arasındaki uyumlu ya da uyumsuz etkileşimler, SA, JA ve şikimik asite bağlı bitki savunma yolları ile alakalıdır (El-Khallal, 2007). Patojen saldırılarda ya da hassas

davranışlarda bitkinin savunma cevabı patojenin çoğalmasını ve yayılmasını engelleyecek geniş bir ürün mekanizmasını düzenler (Malolepsza ve Rozalska, 2005). Savunma mekanizması reaktif oksijen türlerini hızlı bir şekilde üretir, hücre duvarı içeriğini değiştirir, fitoaleksinler gibi sekonder antimikrobiyal metabolitleri biriktirir, savunmada görev alan protein ve peptitleri aktive eder ya da sentezler (El-Khallal, 2007).

Bitki hormonu absisik asit (ABA) bitkinin gelişmesinde, stomal açıklığın düzenlenmesinde ve değişen çevresel şartla uyum yanıtlarının başlamasında önemli rol oynar. ABA kontrolü ve biyotik stres sinyallerinde ortak birçok elementin rolü görülse de ABA'nın hastalık direncindeki rolü çok iyi tanımlanamaz (Mauch-Mani ve Mauch, 2005). ABA'nın, ET ve şeker aracılığı ile sinyallerle etkileşerek patojenleri yendiği hakkında deliller vardır (Leon ve Sheen, 2003). Yüksek ABA konsantrasyonu ET üretimini inhibe eder (LeNoble ve ark., 2004). ABA ve ET, bitkinin ve vejetatif dokularının gelişmesinde çoğunlukla zıt bir etkileşim içindedir (Anderson ve ark., 2004). ABA ve JA'tin sinyal yolları etkileşimlerinin sinerjistik ve antagonistik etkileri vardır (Stoswick ve ark., 1992; Moons ve ark., 1997). Bu karşılıklı karmaşık etkileşim Anderson ve arkadaşları (2004) tarafından *Arabidopsis* üzerindeki yeni incelemelerde yayımlanmıştır. Yüksek ABA konsantrasyonu JA ya da ET savunma genlerinin cevap seviyesini güçlü şekilde azaltır (Mauch-Mani ve Mauch, 2005). Ca^{+2} sinyali hastalık direncinde, ABA'nın stomal hareketlerinin kontrolünde ve dehidrasyona cevabında önemlidir (Blume ve ark., 2000).

Savunma sinyal molekülleri JA, SA ve ET ilk direnç cevabının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Corone ve ark., 2001). Bir çok durumda, mikrobial patojenle enfekte olma ve herbivor böceklerin saldırısına uğrama durumunda savunma ile alakalı genlerin farklı düzenlemelerle harekete geçmesini ve bu hormonların yüksek ürünlerle birleştirilmesini uyarır (Maleck ve ark., 2000; Reymond ve ark., 2000; Schenk ve ark., 2000). SA, JA ve ET'ne bağlı sinyal yollarının birbirlerini olumlu ya da olumsuz etkileyebildikleri hakkında bol kanıtlar vardır. Çoğunlukla SA'e bağlı savunma ve JA'te bağlı savunmaların olumsuz karşı cevap nedeniyle ortaklaştıkları zannedilir (Corne ve ark., 2001). SA, JA ve ET'ne bağlı savunma yollarının birbirlerine etkileri ile ilgili deliller mevcuttur. Örneğin SA ve onun fonksiyonel analogları 2,6 dikloroizonikotinik asit (INA) ve benzotiyadiyazol (BTH) JA'te bağlı savunma genini bastırır (Peno-Cortes ve ark., 1993; Bowling ve ark., 1997; Doherty ve ark., 1988; Fidauntsef ve ark., 1999; Van Wees ve ark., 1999), bekli de JA'in biyosentezini ve faaliyetini engeller (Harms ve ark., 1998; Doares ve ark., 1995). SA ve JA yolları arasındaki açık zıtlığa rağmen , çok sayıda genin bu iki hormon tarafından uyarıldığı yada baskılandığı görülmüştür (Glazbrook ve ark., 2003; Schenk ve ark., 2000). Bazı durumlarda, JA yükselen

hassas patojen bulaşmasına olumsuz karışmaktadır. Örneğin, koil ve MAP kinaz mutant 4 (mpk 4), JA cevabının gen ifadesini bozar (Petersen ve ark., 2000), bakterial patojen *P. syringae*'ye hassasiyetin azaldığı görülür (Feys ve ark., 1994; Kloek ve ark., 2001; Petersen ve ark., 2000). Domateste patojenin farklı yaşam tarzlarının geniş sıralamaları üzerine JA cevabının etkilerinin geciktiği görülmüştür (Thaler ve ark., 2004). ET hareketinin sıklıkla JA'yı harekete geçiren savunma ile ilgili genlerle alakalı olduğu ifade edilir (O' Donnell ve ark., 1996; Rojo ve ark., 2003; Xu ve ark., 1994). JA ve ET yolları arasında bazı olumsuz etkileşimlerin olduğu hakkında yayımlar vardır. Örneğin, JA ve ET bütün bitkisinde herbivorlara karşı sentezlenen nikotin bileşikleri üstünde zıt etkileri vardır (Shoii ve ark., 2000). JA ve ET arasındaki sinerjizmin klasik bir örneği *Arabidopsis*'te savunma geni PDF1.2'nin patojen uyarımı ile ifade edilmesidir (Penninckx ve ark., 1998).

Glikoz ve fruktoz miktarı domates bitkisinin toplam şeker miktarının %95' ini oluşturur, oysa sukroz domates meyvesinde az miktarda saptanmıştır. Genellikle mikroorganizmaların rizosferde çözünebilen bileşikleri kullandıkları bilinir, rizosfer kolonilerinin temel besin sağlayıcıları ve büyük besin kaynakları bitki kökleridir. Bu çözünen bileşikler arasında en çok kullanılanların şekerler olduğu rapor edilmiştir Şekerler ve organik asitlerin aksine uygun olmayan çevresel koşullarda prolin birikmesi çok düşük bir orandadır (Perez-Alfocea ve ark., 1993). Bir domates bitkisinin stres durumunu yaprakların prolin içeriğinin yansıttığı düşünülür çünkü bu olay bitkinin gerçek su içeriği, osmotik ve su potansiyeli ile yakından ilişkilidir (Claussen ve ark., 2006). Prolinin, tuz stresi, su kıtlığı ve yüksek radyasyon yoğunluğu gibi geniş stres durumlarında birçok bitki türünde biriktiği bilinir (Aspinall ve Paleg, 1981). Prolin birikmesinde, osmotik stresin algılanmasında iş gören doğal sinyal yolları hakkında sınırlı bilgiler vardır (Hare ve ark., 1999). Stres durumunda bitki yapraklarında prolinin birikmesi yavaş bir süreçtir. Son zamanlarda prolin içeriğinin artışının bitki strese girdikten 16-24 saat sonra algılandığı rapor edilmiştir (Claussen, 2005). Bitki dokularında prolin yoğunluğunun artışı yada azalışından önce, prolin oksidasyonu ve sentezinin anahtar enzimlerini şifreleyen genlerin ifade edilmesinin tuz stresi ve osmotik stres tarafından kontrol edildiği gözlenmiştir (Verbruggen ve ark., 1993; Strizhov ve ark., 1997). Birçok abiyotik ve biyotik çevresel stres durumunda yüksek bitkilerin metabolik ve fizyolojik ürün karakteri değişir (Miteva ve ark., 2005). Patojenlerin etkileri sonucu bitkinin fotosentez oranı, pigment içeriğinde azalma, çözünür şeker içeriği, nişasta birikiminin azalması ve solunum oranının artması gibi fizyolojik işlevlerinin etkilendiği rapor edilmiştir (Radwan ve ark., 2007). Son zamanlarda domates yapraklarının prolin içeriğinin, yaprakların su içeriği, osmotik ve su potansiyeli ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür, bu olay bitkilerde

kullanılan bir stres göstergesidir (Grote ve ark., 2006). Serbest prolin birikmesi tipik bir stres cevabıdır. Prolinin osmotik stres durumundaki koruyucu rolü iyi anlaşılmasına rağmen, fonksiyonunun osmolit ya da reaktif oksijen türleri ile uyumlu olduğu düşünülür. Yüksek bitkiler serbest L-prolini kuraklık, tuz stresi ve UV radyasyonu gibi değişik çevresel şartlara karşı bir cevap olarak biriktirirler. Prolin birikmesinin osmolitle, kararlı zar parçaları, ikincil hücre parçaları ve mitokondriyal elektron taşıma sistemi II içeriği ile uyumlu bir fonksiyonu olduğu düşünülür (Fabro ve ark., 2004). Prolin birikmesi ve osmotik stres arasında pozitif bir uyum olduğu birkaç çalışmada rapor edilmiştir (Gilmour ve ark., 2000; Nanjo ve ark., 1999). Yüksek bitkilerde prolin yoğun stres şartları altında glutamat veya ornitinden sentezlenir (Delauney ve Verma 1993; Roosens ve ark., 1999). Kloroz, klorofil metabolizmasının bozulmasından kaynaklanmaktadır (Türkkan ve Dolar, 2008). Konukçuya özellikli olmayan faseolotoksin, ornitin ve karbomil fosfatın sitrüline dönüştüğü üre döngüsünde gerekli bir enzim olan karbomoyiltransferaz enziminin inhibitörüdür. Bitkide bu enzimin engellenmesi ornitin birikmesine yol açarak kloroza neden olmaktadır (Zhang ve ark., 1993). Tabtoksin- β -laktam bitkide amonyak detoksifikasyonu için gerekli olan glutamin sentetaz enzimini engellemektedir. Bunu takiben bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda amonyak birikmekte ve kloroplastların tilakoid zarının bozulmasına ve fotofosforilasyonun gerçekleşmemesine neden olmaktadır (Mitchell, 1991).

Nitrojen metabolizması temel metabolizmanın bir görünüşüdür (Lucas, 1998). Patojenlerin bitkinin diğer işlevleri üzerindeki etkisi ne kadar az bilinse de fotosentez ve solunum gibi fizyolojik faaliyetleri üzerindeki etkisi iyi bilinir. Bu temel fonksiyonlardan biri olan nitrojen metabolizmasının patojenle uyumlu etkileşim süresince fakirleştiği bilinmektedir. Nitrojen birçok bitki türü ve yaşayan organizmalar için temel sınırlayıcı bir besindir (Olea ve ark., 2004). *P. syringae*'nin sebep olduğu hastalığın biyokimyasal ve moleküler temeline dikkatle bakıldığında amonyak iyonlarının birikmesi ve amonyak gazlarının değişiminin bakteriyel lekelerin gelişmesine katkıda bulunduğu gözlenir. Diğer taraftan, nitrojen bitki metabolizması için anahtar bir elementtir, bitkiler bu esasi elementin yeniden asimilasyonu için etkili mekanizmalar geliştirirler (Olea ve ark., 2004). Nitrojen varlığının bitkilerin patojene karşı direncindeki etkisi iyi saptanmalıdır (Engelhard, 1989; Huber ve Watson, 1974; Marschner, 1995). Etkiler belki konukçu bitkinin N besinine (Huber ve Watson, 1974), patojenin tipine (Buschbell ve Hoffman, 1992; Marschner, 1995), yada N isteğinin eşit zamanına bağlıdır (Carballo ve ark., 1994). Bununla beraber, sistematik çalışmalar kontrol şartları altında ihtiyaç duyulan N stoğunun hastalık direnci üzerine etkilerini araştırmalıdır (Hoffland ve ark., 2000). Son zamanlarda yeşil kelliğe sebep olan

fungus patojen *Botrytis cinerea*'ya karşı domates direncinin N varlığı ile pozitif bir uyum içinde olduğu yayımlanmıştır (Hoffland ve ark., 1999). Bu keşif besin varlığının bitki savunma stratejileri üzerine yaygın olan hipotezle uyumsuz, hipotezin temel varsayımlarına göre büyüme şartları altında bitkiler besin varlıklarını daha iyi korumalıdır (Bryant ve ark., 1983; Herms ve Mattson, 1992). Domates yapraklarında N varlığının azaldığı, savunma ile ilgili bileşiklerin sentezinin arttığı bulgular ile uyumsuz (Wilkens ve ark., 1996). Belki de N varlığının direnç üzerine etkisi domateste *B. cinerea* patojenine özeldir (Hoffland ve ark., 2000).

Nitrat birçok meyve ve sebzede doğal olarak bulunur. Nitrat kirliliği, ürünün büyümesini güçlendirmek için daha fazla absorbe etme gereksiniminden kaynaklanır. Ispanak, brokoli, lahana, salata, kereviz, kırmızıturp ve benzeri bitkiler nitrat biriktirme eğilimine sahiptir. Diğer taraftan sebzeler örneğin havuç, karnabahar, bezelye ve patates nadiren nitrat biriktirir (Prasad ve Chetty, 2008). Nitrat, nitrit ve oksalat bileşiklerinin insanlar üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı sebzelerde bulunması istenmez (Crawford ve Glass, 1998). Nitratın yüksek bitkilerde amonyak yolu ile asimile edildiğinin önemi kesinlikle saptanmıştır. Farklı birkaç araştırmadan gelen deliller, ilk olarak amonyakta nitratın azaldığını gösterdi. İkinci olarak, nitrat ve amonyağın başlıca protein ve aminoasit üretimindeki benzer etkileri gösterdi. Son olarak, amonyağın glutamin ve glutamat yolu ile organik nitrojen maddelerini direkt olarak kapsadığı gösterildi (Sanderson ve Cocking, 1963). Bitkilerin gövde ve yapraklarında nitrat birikmesi topraktaki yüksek oranda nitrat ya da amonyak varlığı ile ilişkilidir. Genç bitkiler yaşlı bitkilerden daha fazla nitrat seviyesine sahiptir. Bitkilerin büyüdüğü toprakta besin eksikliği ya da fazlalığı olduğu zaman bitkiler yavaş büyüebilir ya da nitrat birikmesi artabilir. Nitrat birikmesi sap ve gövdede dolu yolu ile yaprakların kaybı ya da bitkiye herbisidlerin saldırısı ile oluşabilir. Bitkilerin nitrat biriktirmesinin büyük bir nedeni kuraklıktır. Bitkiler güneş ışığının azalan periyodu boyunca nitrat biriktirebilir. Bitkide fotosentezin ve nitrat redüktaz sisteminin sürmesi için güneş ışığına ihtiyaç vardır (Nicholson, 2007). Bitkiler karmaşık savunma mekanizmaları yardımı ile biyotik ve abiyotik streslere cevap verirler. Bu mekanizmalar arasında NO patojen saldırısına direncin gelişmesi için başlıca sinyaldir. Birçok savunma cevabı patojen saldırısının ardından serbest radikal seviyelerinin artışı NO tarafından uyarılır. NO'nun biyosentetik kökeni bitki patojen etkileşimi sırasında NADPH ve O₂'ye bağlı, L-arjinin, L-sitrülin dönüştürülen NOS-benzeri aktivitesini içerir (Modolo ve ark., 2006).

Sebzeler insan beslenmesinde yaşamsal öneme sahiptir, iyi bilinen bu özellikleri yapılarındaki iz elementler tarafından sağlanır. Mikro ve iz elementler organik yada bitki

kaynaklı elde edilirse sağlık açısından faydalıdır, bunun aksine inorganik yada metalik kaynaklardan temin edilirse insan bünyesinde toksin etkisi gösterirler (Mohamed ve ark., 2003). Çok sayıda element örneğin As (III), Al, B, Be, Cd, Co, Cr (VI), Cu, Mo, Ni, Se(IV) ve Ti yüksek yoğunluğa ulaştığında bitkiler ve insanlar için zararlıdır (Bowen, 1979). Al, As, Au, Br, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Sb, Se, W ve Zn gibi elementler mısır ürünlerinde, Afrika çayında, zencefil, siyah biber, salatalık fidesi, domates ve susam bitkisinde bulunur (Sherif ve ark., 1980). Mevcut bilgiler N₂ fiksasyonu yapan legümenler hariç yüksek bitkilerin kobalt'a (Co) ihtiyaç duymadığını işaret eder (Chatterjee ve Chatterjee 2003). Anderson ve arkadaşları (1973) Co yoğunluğunun toprakta 0.03- 0.14 ppm'den fazla olduğunda toksin etkisinin geliştiğini fark etti fakat diğer bazı araştırmacılar Co toksitesinin yapraklarda 50 ppm'den fazla yoğunluğa ulaştığında fark edildiğini önerdi. Bazı makaleler ise 0.1 ppm Co varlığının bitki metabolizmasını olumsuz yönde etkileyebildiğini açıklamıştır (Chatterjee ve Chatterjee 2003). Kobalt bitkinin mevcut büyüme ortamındaki, büyüme ve metabolizmasına bağlı birkaç enzim ve koenzim ile dolaylı olarak ilişkisinin olduğu rapor edilmiştir (Marschner 1995).

Geniş spektrumlu savunmanın aksine yaygın özellikteki patojenlere karşı bitkilerinin R genlerinin ürünü PR proteinlerinin hastalıklara direncin kontrolünde yüksek oranda etkisi vardır (Ellis ve Dodds, 2003). Hastalık direnç genleri (R) bitki savunma cevabına özgü bir tanımdır. Bu basit fakat sofistike savunma sistemi bitkinin R genleri ile patojenin avirülans genleri (avr) arasındaki özel etkileşimi içerir. Bu genetik etkileşim oluştuğunda, savunma cevabı tetiklenir. Bu cevap hızlı kalsiyum ve iyon değişimi, oksidatif bir patlama, hastalık bölgesinde transkripsiyonal bir yeniden programlanma ve lokal bir programlanmış hücre ölümü ile karakterize edilir. Bu terim aşırı duyarlı yanıt (HR) olarak bilinir (Belkhadir ve ark., 2004). Domates bitkisinin protein profilinde, *Xanthomonas compestris* pv. *vesicatoria* ile enfekte edildiğinde önemli bir artış gözlenmiştir. SDS-PAGE analizi distile su ile muamele edilen fidelerde 64.7 ile 17.47 kDa arasında değişen ağırlıklara sahip on iki band tespit edilmiştir. *X. compestris* pv. *vesicatoria* ile hasta edilen fidelerde ise 102.75 -15.01 kDa arasında ağırlığa sahip on beş protein bandı görülmüştür (El-Hendway ve ark., 2007). *P. syringae* pv. *tomato* ile enfekte edilen Falkon tipi domates fidelerinde aşılamadan 7 ve 9 gün sonra 18-24 kDa ağırlığında iki band tespit edilmiştir. Gerek virüs enfeksiyonu, gerek fungus ve bakteri ve gerekse abiyotik faktörlerle uyarılan PR-proteinlerinin genelde konukçuya özgü olduğu ve küçük molekül ağırlığına (10-40 kDa arasında) sahip olduğu tespit edilmiştir (Cömert,1994). El-Khallal (2007) *Fusarium oxysporum* ile enfekte ettiği domates fidelerinde

65.0, 16.3 ve 12.5 kDa ağırlığına sahip protein bantlarının sağlıklı bitkide mevcutken hasta bitkilerde gözden kaybolduğunu bildirmiştir.

Domates bitkisi üzerinde birçok çalışma yapılmış olmasına karşın hastalık sonrası bitkide meydana gelen değişikliklere ilişkin çalışma sayısı azdır. Özellikle nitrit-nitrat miktarları, hastalık sonrası şeker ve hormon içeriği, hastalık sonrasında iz element miktarında meydana gelen değişimlere ilişkin çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Bu çalışmanın amacı hastalık sonrasında domates fidelerinde meydana gelen değişiklikleri kapsamlı bir şekilde ortaya koymak ve meydana gelen değişiklikler ışığında *P. syringae* pv. *tomato* ve benzer patojenlere karşı bitkinin ne gibi tedbirler aldığını ortaya koymaktır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Domates bitkileri

Bu çalışmada, bitki materyali olarak Biotek Tohumculuğun Falcon tipi domates (*Lycopersicum esculantum* Mill.) tohumlarının çimlendirilmesiyle üretilen fideler kullanıldı.

3.1.2. Bakteri kültürü

Araştırmada, Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Almanya)'dan temin edilen *P. syringae* pv. *tomato* DSM 60407 patojen suş kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Domates bitkilerin yetiştirilmesi

Bitkilerin yetiştirilmesi sırasında kültür toprağı ve sera toprağı steril edildikten sonra 1-1 oranında karıştırılarak kullanıldı. Tohumlar önce cam petrielerde bir hafta süresince çimlendirildi, daha sonra çimlenen tohumlar uygun büyüklükte plastik pet bardaklara alındı. Bir hafta pet bardaklarda geliştirilen fideler hazırlanan 30 cm çapında saksılara (her saksıda 5-6 fide olacak şekilde) uygun aralıklar bırakılarak şaşırtıldı. Saksılar gerekli nem ve sıcaklık şartlarına sahip cam serada 20 gün boyunca geliştirildi ve periyodik olarak günde iki kez steril çeşme suyu ile sulandı.

3.2.2. Bakterinin geliştirilmesi ve stok kültürün hazırlanması

P. syringae pv. *tomato* DSM 60407 suşu King Medium B agara (Fluka) öze yardımı ile ekildikten sonra 48 saat 28°C de geliştirildi. Senkron kültür elde etmek için gelişen tek kolonilerden bir öze dolusu alındı ve tekrar 24 saat 28°C de geliştirildi. Bu süre sonunda gelişen bakteri hücreleri besi yerinin yüzeyinden 10 ml steril serum fizyolojik su ile yıkanarak steril bir erlenmayer'e alındı ve dökme plaka yöntemi kullanılarak stok kültürün 1 mililitresindeki bakteri sayısı hesaplandı. Bakteri stok solüsyonu aşılama yapılmaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.3. Aşılamanın yapılışı

Hazırlanan stok kültür solüsyonundan ml'sinde 1×10^7 (CFU/ml) sayıda bakteri olacak şekilde aşılama süspansiyonu hazırlandı (Kategori ve ark, 2002). Dört hafta (20 gün) geliştirilen domates bitkilerinin yaprak ve gövdelerine enjektör yardımı ile fazla zarar verilmeden yaralar açıldı ve bu yaralardan bakteri aşılması gerçekleştirildi. Ayrıca bu yüzeylere aşılama süspansiyonu el spreyi ile püskürtüldü. Aşılama sonrası bitkinin çevresinde nem oluşması için şeffaf naylon torbalarla bitkinin etrafı kapatıldı. Bütün aşılama 2-3 saat içinde tamamlandı ve 5 gün sonra torbalar çıkarıldı. Kontrol grup olarak aşılama patojen ile aşılama yapılmamış domates fideleri kullanıldı.



Şekil 3.1. Domates fidelerinin hastalandırılmasına ilişkin fotoğraf.

3.2.4. Bitki örneklerinin alınması

Örnekler aşılamanın yapıldığı gün altıncı saat (0. gün) ve aşılama sonrası 1, 2, 4, 8 ve 10. günlerde toplandı. Toplanan örnekler ağzı kilitli buzdolabı poşetlerine konarak -70°C de derin dondurucuda daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

3.2.5. Bitki örneklerinden proteinlerin ekstraksiyonu

Derin dondurucuda bekletilen yaprak örneklerinden 1 g tartılarak buz içerisindeki porselen kroze alını ve üzerine 2 ml QB solüsyonu ilave edilerek iyice ezildi. Elde edilen ekstraktan 1 ml alınarak 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatanttan temiz bir Eppendorf tüpüne alındı ve üzerine 5:1 oranında örnek tamponu ilave edildi. Üzerine örnek tamponu ilave edilmiş Eppendorf tüpleri 100°C'de 5 dk. kaynatılarak çözümlenen proteinler ekstrakte edildi. Ekstraktlar elektroforez yapılıncaya kadar -70°C'de bekletildi.

3.2.5.1. SDS-PAGE yapılışı

Ekstrakte edilen çözümlenen proteinlerin 1 mm kalınlığında (%4'lük stacking ve %12'lik resolving) jelde yürütülerek Coomassie Brilliant Blue (R-250) ile boyandı (Laemmli, 1970). Koşurma işlemi dikey elektroforez tankında (UVP Vertical Electrophoresis Unit, Cambridge, UK) stacking jel boyunca 20 mA ve resolving jel boyunca 30 mA'lık sabit akım uygulanarak gerçekleştirildi. Daha sonra jellerin boyası alınarak protein bantları görünür hale getirildi. Son olarak jellerin fotoğrafları dijital fotoğraf makinesi (FinePix S9500, Fuji, Japan) ile çekilerek diğer işlemler için bilgisayar ortamına aktarıldı. Ayrıca, proteinlerin molekül ağırlıkları standart marker (PageRuler™ Protein Ladder, Fermentas) kullanılarak hesaplandı.

3.2.6. Hormonların Ekstraksiyon, Saflaştırma ve Analiz İşlemleri

3.2 6.1. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri

Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri Kuraishi ve ark. (1991) ve Battal ve Tileklioğlu (2001), metotlarına göre ve üç tekrarlı olarak yapıldı. Derin dondurucudan çıkarılan küçük parçalar halindeki örnekler sıvı azot içerisinde bir havan yardımıyla toz haline getirildi. Toz haline getirilen örnekler üzerine -40°C 'de bekletilen %80'lik metanol ilave edildi (Davies, 1995) ve 10 dk. ultra doku parçalayıcıda (Ultrasonic Processor, Jencons LTD.) homojenize edildikten sonra, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve karanlıkta 24 saat homojenize işlemine devam edildi. Örnekler Whatman No:1 filtre kâğıdından süzüldü ve supernatant alındıktan sonra kalan parçalar tekrar aynı işlemlere tabii tutuldu ve sonra her iki supernatant birleştirildi. Birleştirilen supernatantlar tekrar $0.45\ \mu\text{ml}$ 'lik PTFE filtrelerinden (Cutting, 1991) geçirildi ve bir evaporator pompası yardımıyla 35°C 'de kurutuldu. Kurutulan ekstraktlar 0.1 molarlık KH_2PO_4 (pH 8) tamponunda tekrar çözüldü. Çözünen ekstraktlarda bulunan yağ asitlerini ayırmak için örnekler 1 saat 4°C 'de $5.000\ \text{rpm}$ 'de sanrifüj (Hermle, Z 320 K) edildi. (Palni ve ark., 1983). Supernatant otomatik pipetle tüplerden alındı ve bir beher içerisine bırakıldı. Fenolik bileşikleri ve renk maddelerini ayırmak için (Qamaruddin, 1996; Chen, 1991; Kovac ve Zel, 1994), her örneğe ait 1 gramlık çözünmeyen Polivinilpolipirolidon (PVPP, Sigma) hazırlandı ve süpernatantın bulunduğu beher içerisine bırakılarak, iyice karıştırıldı (Money ve Staden, 1984; Hernandez-Miana, 1991).

PVPP (Polivinilpolipirolidon)'nin hazırlanması: 1 gram çözünmeyen PVPP bir beher içerisine bırakıldı ve üzerine 30 mM asetik asit konarak süspansiyon şeklinde iyice karıştırıldıktan sonra süzüldü. Tekrar üç kat hacimdeki asetik asitle yıkanıp süzüldükten sonra kullanıldı.

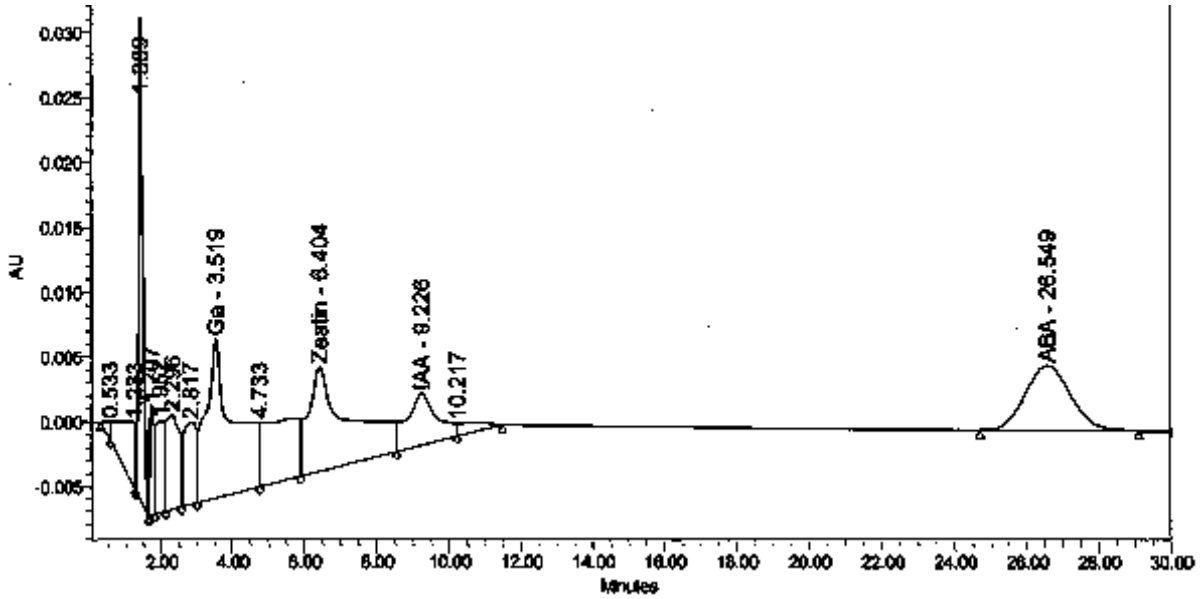
PVPP ile karıştırılan süpernatant Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülerek PVPP'den ayrıldı. Ekstrakt alınarak ya hemen kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -40°C 'de saklandı (Cheikh ve Jones, 1994). Daha spesifik ayırma yapabilmek için Sep-Pak C18 (Waters) kartüjleri kullanıldı (Machackova ve ark., 1993). Kartüjler kullanılmadan önce aşağıdaki açıklandığı şekilde şartlandırıldı.

Şartlandırma işlemi: Kartüjler önce 5 ml %80'lik metanolden geçirildikten sonra, 5 ml saf suyla yıkanmak suretiyle kullanıma hazırlandı. Süpernatantlar (dondurulmuşsa çözünmesi beklendikten sonra) 5 mililitrelik şırıngalarla şartlandırılmış Sep-Pak C18 kartüjlerinden (1 ml/dak) geçirildi.

Kartüjler tarafından adsorbe edilen hormonlar %80'lik metanolde (1 g. taze örnek için 3 ml) çözmek suretiyle küçük şişelere alındı. Küçük şişelere alınan numuneler HPLC analizleri için kullanıldı (Qamaruddin ve ark., 1990).

3.2.6.2. Hormonların analizi

Hormon analiz yönteminde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanıldı.



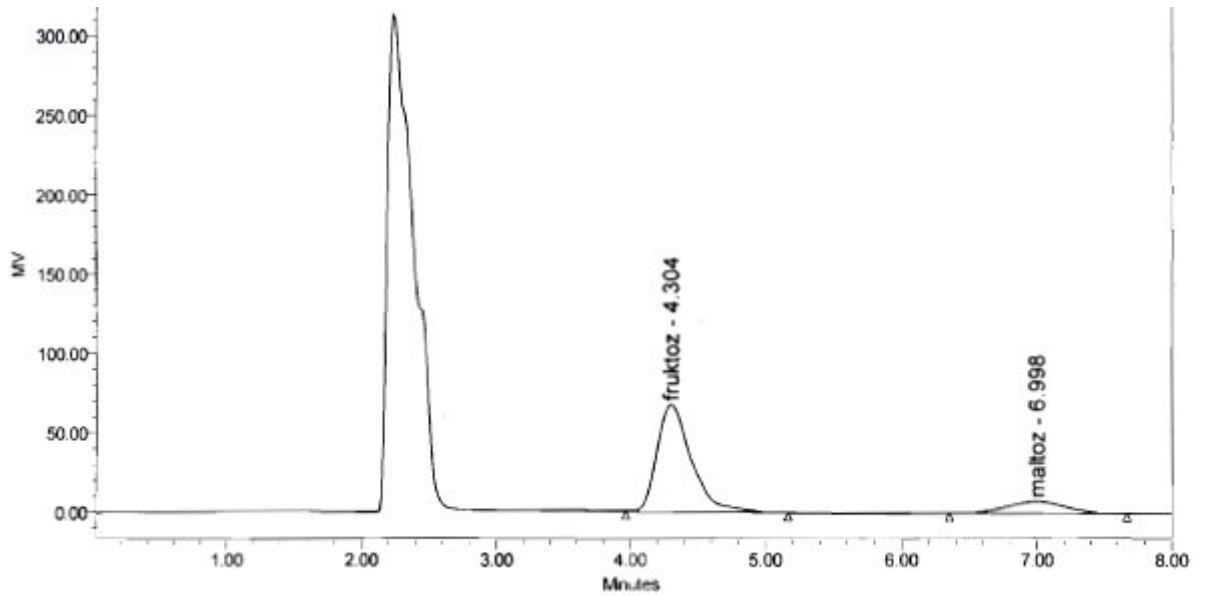
Şekil 3.2. Hormonlara ait HPLC kromatogramı. Alıkonma zamanları: Ga 3.519 dk., Zeatin 6.404 dk., IAA 9.226 dk. ABA 26.594 dk. Kolon: Waters Boudpak C18; Dedektör: UV Waters 2487 Dual λ Absourbans Dedector; Dalga boyu 245 nm; Mobil faz: %11'lik asetonitril (pH: 4,91); Akış hızı: 2.0 ml/dk.

3.2.6.2.1. IAA ve ABA'nın analiz yöntemi

Derin dondurucuya alınmış olan taze bitki materyallerinden 1 g alınarak, sıvı azotta toz haline getirildi ve %80'lik metanolde homojenize edilerek süzüldü. Önce rotary evaporatörde metanol uçuruldu ve 10 ml bidistile suyla alınan ekstrakt PVPP den geçirildi. Sulu fazın pH'sı daha sonra 2.7'ye ayarlandı ve C18 kartüjünden geçirildi, sonra kartüj bünyesinde kalan hormon %80'lik metanolle çözülerek küçük viallere alındı ve HPLC'ye enjekte edildi.

3.2.6.4. Serbest şekerlerin analizi

Serbest şekerlerin analizleri Torije ve ark. (1998) ile Karkacier ve ark. (2003)'ün metotları modifiye edilerek yapılmıştır. 10 g. örnek havan yardımıyla sıvı azot ile birlikte toz haline getirildi, üzerine 40 ml %80'lik metanol ilave edildi.



Şekil 3.3. Şekerlere ait HPLC kromatogramı. Alıkonma zamanları: Furuktoz 4.304 dk., Maltoz 6.998 dk. Kolon: Waters Spherisorb 5 μ m NH₂; Dedektör: Refraktif İndeks; Mobil faz: %78'lik asetonitril; Akış hızı: 1.5 ml/dk

Son karışım magnetik karıştırıcı ile 20 dk homojenize edildi. 300 rpm'de 20 dk, uygun sıcaklıkta santrifüj yapıldı. Supernatantların hacmi %80'lik metanolle 50 ml'ye tamamlandı.

Bu ekstraktın metanolu rotary evaporatörde uçuruldu. Arta kalan residü metanolle 50 ml'ye tamamlandı. Bu ekstraktlar Sep-Pak C18 kartüjlerinden geçirildi. Filtratın 2.5 ml'si, 7.5 ml asetonitril ile karıştırıldı ve 0.45 µm membran filtreden geçirildi ve HPLC'ye enjekte edildi. Standart fruktoz, sakkaroz ve glukoz çözeltileri kullanılarak HPLC cihazı kalibre edildi. Standart çözeltilere ait kromatogramlar ve HPLC şartları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

3.2.6.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile analiz işlemleri

Çalışmamızda, indol asetik asit ve absisik asit analizlerinde HPLC kullanıldı (Horgan ve Kramers, 1979; Koshimizo ve Iwamura, 1986; Morris ve ark., 1990). HPLC analizleri aşağıdaki sistemler kullanılarak yapıldı.

a) Pompa: Araştırmamızda basıncı 20.000 psi'ye kadar çıkabilen Waters marka (Waters 1525) pompa kullanıldı (Robyt ve White, 1990).

b) Dedektör: Çalışmamızda Waters marka ve 4020 model UV dedektörü kullanıldı (Roberts ve Hooley, 1988; Horgan, 1988). Dedektörün en uygun dalga boyunun ise 245 nm olduğu tespit edildi (Fetonby-Smith ve Van Staden, 1984; Banowetz, 1994).

c) Kolon: Çalışmamızda Bondapak C18 (Waters; 30x0,2 cm) kolon kullanıldı (Horgan ve Kramer, 1979; Brenner, 1981; Palni ve ark., 1983; Hernandez-Miana ve ark., 1989; Chen, 1991).

d) İzokratik sistem: Bu sistemde, sabit konsantrasyondaki mobil fazın dk.daki akış hızı ile beraber maddelerin kolonlardaki alıkonma zamanına bağlı olarak birbirlerinden ayrılabilmesi temeline dayanmaktadır. Çalışmamızda izokratik sistem kullanıldı (Turnbull ve Hanke, 1985; Taylor ve ark., 1990).

e) Kaydedici: (Integratör): Dedektörün gönderdiği uyarılar Waters marka ve Breeze Software tarafından kaydedildi.

f) Mobil faz: Çalışmamızda %11'lik asetonitril (HPLC'ye özgül, Merck) tampon olarak 40 mM trietil amonyum asetat (TEAA) ilave edildi ve pH'sı 4,91'e ayarlanan mobil faz kullanıldı (Hansen ve ark., 1984; Soejima ve ark., 1992; Kovac ve Zel, 1994; Chamberlain, 1995).

TEAA'nın hazırlanması: Belli bir miktarda trietilamin (Merck) alınarak bir mezür içerisine bırakıldı. Üzerine trietilamin miktarından biraz daha az olacak şekilde asetik asit

yavaş yavaş ilave edildi (Fritz ve ark., 1978). Daha sonra buzdolabına bırakıldı ve soğuduktan sonra kullanıldı.

g) Degaze işlemi: Millipore marka vakum pompası kullanılarak pH'sı ayarlanan mobil fazda oluşan gazlar uzaklaştırıldı.

3.2.7. Toplam Klorofil ve Karotenoid Tayini

3.2.7.1. Toplam klorofil tayini

Bitkilerin hasat edilme zamanında her gruptan alınan 0,1 gram yeşil yaprak örnekleri klorofil analizleri için kullanıldı. Bu örnekler %80'lik aseton içerisinde iyice ezildi. Ezilen örnekler bir mezür yardımıyla filtre kağıdından süzülerek 10 ml'ye tamamlandı. Elde edilen pigment ekstraktlarının 645 ve 663 nm'lerdeki absorban değerleri spektrofotometrede (Shimadzu, UV-Vis Spectrophotometer) okundu. Okunan bu absorban değerleri aşağıdaki formüllerde yerine konarak klo-a, klo-b ve total klorofil değerleri bulundu.

$$\text{Klorofil a} = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$\text{Klorofil b} = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$\text{Total Klorofil} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

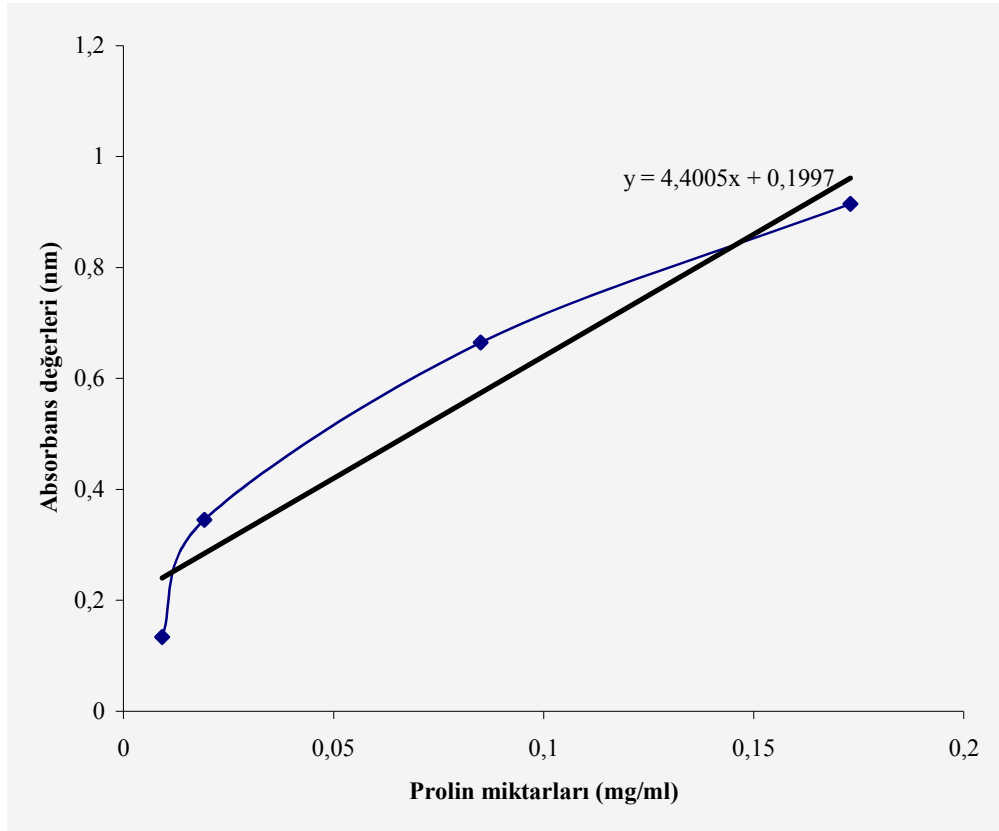
3.2.7.2. Karotenoid tayini

Yukarıdaki uygulamada olduğu gibi, ekstraktın 450 nm'deki absorban değeri spektrofotometrede okundu. Okunan bu değer aşağıdaki formülde yerine konarak toplam karotenoid miktarı hesaplandı.

$$\text{Top. Karotenoid} = 4.07 \times A(450) - (0.0435 \times \text{klo-a miktarı} + 0.367 \times \text{klo-b miktarı})$$

3.2.8. Prolin Seviyesinin Belirlenmesi

Prolin analiz işlemleri, Bates ve ark. (1973) ile Gholuşm ve ark. (2002)'nin yöntemleri modifiye edilerek yapılmıştır. Bunun için 100 mg'lık taze yapraklardan %40'lık 2 ml metanolla ekstarkte edildi. 1 ml ekstrakt, glasiyel asetik asit ve ortofosforik asit (6 M) (3:2 v/v)'in 1 mililitresi ve 25 mg ninhidrin ile karıştırıldı. 1 saat 100°C'de inkübe edildi. Sonra tüpler soğutuldu ve 5 ml toluen ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra, en üstteki fazın absorbansı spektrofotometrik olarak 528 nm dalga boyunda (Shimadzu, UV-Vis Spectroptometer) okundu. Prolin miktarları EasyPlot (Eplot) programı kullanılarak, standart regresyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.2) ve bu standart eğrilerden EasyPlot programı yardımıyla, spektrofotmetrede absorbansı belirlenen örneklerin miktar tayini yapıldı.



Şekil 3.4. Standart prolin miktarlarına ait absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisi.

3.2.9. İz element analizi

5 g yaş örnek tartıldı ve krozelere kondu. Örnekler 105°C'lik etüvde 4-5 saat bekletildikten sonra kuruyan örnekler iyice temizlenmiş porselen havanlarda ezildi. Elde

edilen ekstraktan 0.25 g. madde tartıldı ve her örnek üzerine etil alkol- sülfürik asit karışımından 2 ml ilave edilerek 250°C'ye ayarlanmış kül fırınına bırakıldı. Fırının sıcaklığı 550°C'ye ulaşınca kadar sıcaklık saat başı 100°C arttırıldı. Sıcaklık 550°C'ye geldiğinde örnekler bir gece bu sıcaklıkta bekletildi. Fırından çıkarılan örnekler üzerine hazırlanan 3 N HCL' den 1.25 ml ilave edildi ve distile su ile 12.5 ml' ye tamamlandı. Bu işlemden 5- 6 saat sonra örnekler mavi-bantlı filtre kâğıdı kullanılarak süzüldü. Süzme işleminden sonra örneklerin hacimleri tekrar kontrol edildi ve eksik olan hacimler distile su ile tekrar 12.5 ml' ye ayarlandı. Hazırlanan örnekler atomik adsorbsiyon cihazında (Thermo Electron Corporation, Solar House, Cambridge England) okundu (Zurera ve ark. 1987).

3.2.10. Nitrat-Nitrit Analizi

Nitrat ve nitrit analizleri Özcan ve Akbulut (2007) metoduna göre yapıldı. Bitkilerden alınan 10 g. örnek tartılarak sıvı azot içerisinde ezilerek homojenize edildi. Üzerine 200 ml sıcak distile su ilave edildikten sonra elde edilen filtrat Whatman No:1 filtre kağıdından süzüldü.

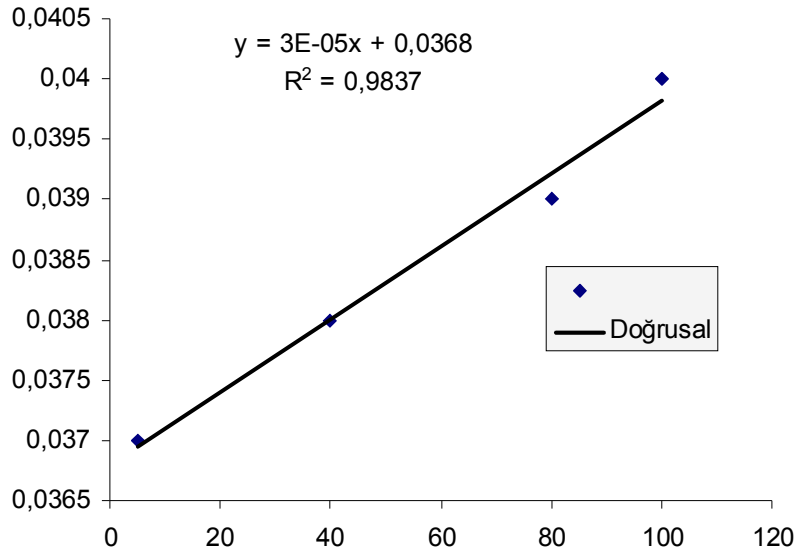
3.2.10.1. Nitrat analizi

Süzme işleminden elde edilen örneklerden temiz balonjölere 20 ml alınarak evaporatörde suları uçuruldu. Oluşan kalıntı 2 ml fenol-di-sülfanoik asitle çözünene kadar karıştırıldı. Üzerine 20 ml distile su ilave edildi. Elde edilen karışımın üzerine 6 ml amonyum hidroksit eklendi ve son hacim distilesu kullanılarak 50 ml'ye tamamlandı. Oluşan çözelti 410 nm'de spektrofotometre cihazında (Shimadzu, UV-Vis Spectroptometer) okundu. Elde edilen sonuçlar hazırlanan standart eğride yerine konarak değerlendirildi (Özcan ve Akbulut, 2007).

3.2.10.1.1. Nitrat standardının hazırlanması

0.15 gr nitrat standardı alınarak bir balonjoje içerisinde 100 ml distile su ile çözüldü. Bu çözülden 10 ml alınarak başka bir bolonjojede hacmi tekrar 100 ml' ye tamamlandı ve elde edilen çözelti çalışma standardı olarak kullanıldı. Çalışma standardı olarak hazırlanan çözülden sırası ile 5 ve 40 ml sıvı temiz balonjölere alınarak hacimleri 100 ml' ye

tamamlandı. İlk hazırlanan ve 90 ml kalan çözeltilerden ise 8 ve 10 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Elde edilen çözeltiler spektrofotometre cihazında 410 nm dalga boyunda okundu ve sonuçlar Microsoft Office Excel (2003) programında standart eğri oluşturulmasında kullanıldı. Oluşturulan eğri Şekil 3.5'de verilmiştir.



Şekil 3.5. Nitrat standart eğrisi

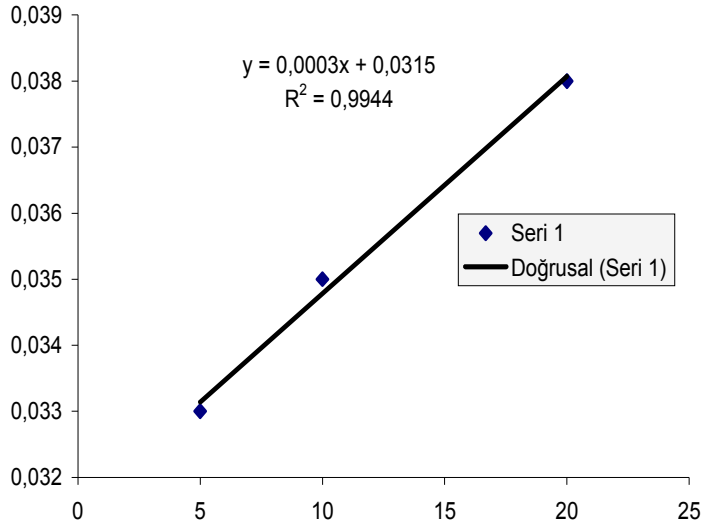
3.2.10.2. Nitrit analizi

Nitrat ve nitrit analizleri için hazırlanan 200 ml'lik çözeltilerden temiz erlenmayerlere 15 ml alınarak üzerine 0.5 ml sülfanilik asit eklendi ve 6- 8 dk. bekletildi. Üzerine 0.5 ml naftilamin eklenerek 2 saat bekletildi. Çözeltinin rengi pembeye dönüşünce 543 nm' de spektrofotometre cihazında okundu. Elde edilen değerler önceden hazırlanan standart eğride yerine konarak değerlendirildi (Özcan ve Akbulut,2007).

3.2.10.2.1. Nitrit standardının hazırlanması

0.1371 gr nitrit standardı alınarak temiz bir balonjojede 100 ml distile su ile çözüldü. Elde edilen çözeltilerden 10 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlanarak çalışma standardı hazırlandı. Hazırlanan çalışma standardından sırası ile 5, 10 ve 20 ml alınarak hacimleri temiz

balonjojelerde 100 ml' ye tamamlandı. Elde edilen çözeltiler spektrofotometre (Shimadzu, UV-Vis Spectrophotometer) cihazında 543 nm dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler Microsoft Office Excel (2003) programında standart eğri oluşturulmasında kullanıldı. Oluşturulan nitrit standart eğrisi Şekil 3.6'de verilmiştir.



Şekil 3.6. Nitrit standart eğrisi

3.3. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada incelen bütün parametreler için en az 2 defa okuma yapıldı. Bütün verilerin istatistiksel analizleri SPSS (sürüm 14.0) istatistik paket programı kullanılarak ortalamanın standart hatası olarak ($\bar{X} \pm SEM$) hesaplandı.

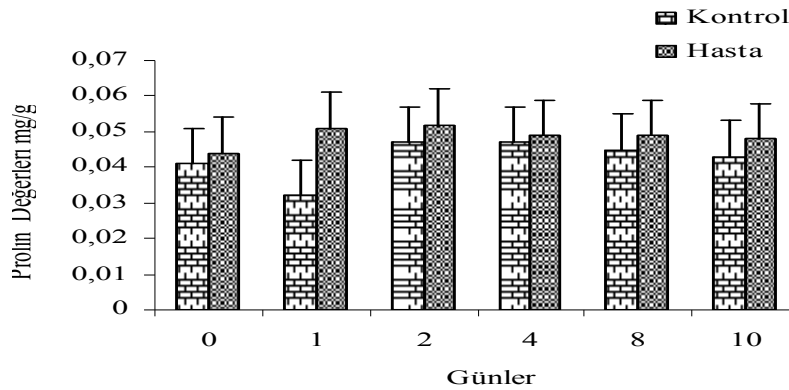
4. BULGULAR

4.1. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerindeki Prolin Düzeylerine İlişkin Bulgular

Yapılan çalışmada *P. syringae* pv. *tomato* DSM 60407 suşunun sebep olduğu hastalığın yapraklardaki prolin miktarı üzerine etkisine ilişkin sayısal değerler Çizelge 4.1'de bu sonuçlara ait grafik ise Şekil 4.1'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde fidelerin bakteri ile aşılandığı ilk günden (0. gün) itibaren hasta bitkilerin kontrol bitkilerine oranla daha fazla miktarda prolin içeriğine sahip oldukları görülmektedir.

Çizelge 4.1. *P. syringae* pv. *tomato* ile aşılanan domates bitkilerindeki prolin düzeyleri

Gruplar	Prolin Değerleri (mg/g)					
	0.Gün	1.Gün	2.Gün	4.Gün	8.Gün	10.Gün
Kontrol	0,0292 ± 0,011	0,031 ± 0,001	0,040 ± 0,007	0,047 ± 0,001	0,042 ± 0,003	0,045 ± 0,002
Hasta	0,031 ± 0,012	0,051 ± 0,01	0,047 ± 0,005	0,051 ± 0,002	0,045 ± 0,004	0,051 ± 0,002



Şekil 4.1. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerindeki prolin düzeyleri.

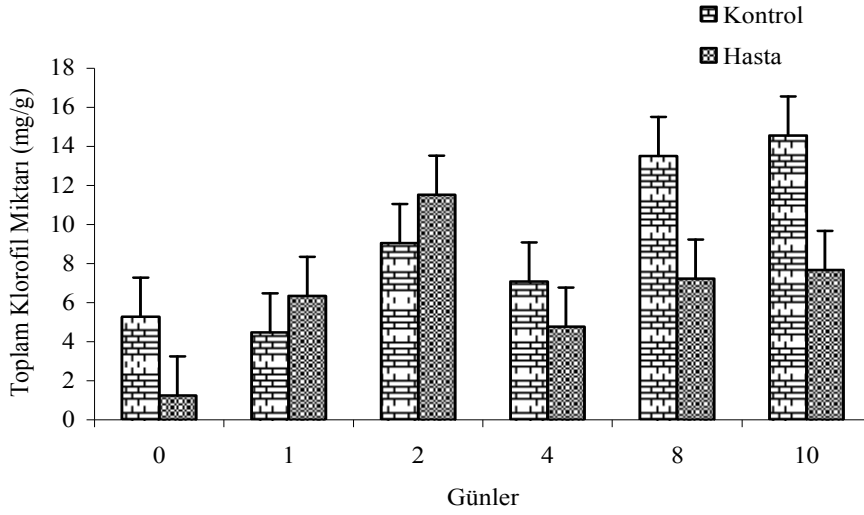
4.2. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerindeki Toplam Klorofil-Toplam Karetenoid Miktarlarına İlişkin Bulgular

4.2.1. Toplam klorofil değerleri üzerine etki

Örneklerin incelenmesi sonucu aşılamanın yapıldığı günden itibaren toplam klorofil miktarlarındaki değişimler Şekil 2’de grafik halinde verilmiştir. Grafiğe ait sayısal değerler ise Çizelge 4.2’de verilmiştir. Grafik incelendiğinde 0. günde kontrole kıyasla hasta bitkinin klorofil oranında yaklaşık dört kat azalma, 1. günde hasta bitkide toplam klorofil miktarının kontrole oranla ortalama bir buçuk kat artış gözlenmiştir. İkinci günde hasta bitkide toplam klorofil miktarının kontrol bitkisinden farklı olarak arttığı, 4., 8. ve 10. günde ise hasta bitkide kontrole kıyasla toplam klorofil miktarının arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.2. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerindeki toplam klorofil düzeyleri

Gruplar	Toplam Klorofil Değerleri (mg/g)					
	0.Gün	1.Gün	2.Gün	4.Gün	8.Gün	10.Gün
	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$
Kontrol	5,282 ± 0,11	4,475 ± 0,07	9,050 ± 0,22	7,080 ± 0,23	13,510 ± 0,19	14,560 ± 0,44
Hasta	1,250 ± 0,03	6,340 ± 0,03	11,525 ± 0,27	4,770 ± 0,11	7,225 ± 0,24	7,665 ± 0,51



Şekil 4.2. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerindeki toplam klorofil düzeyleri.

4.2.2. Toplam karetenoid miktarı üzerine etki

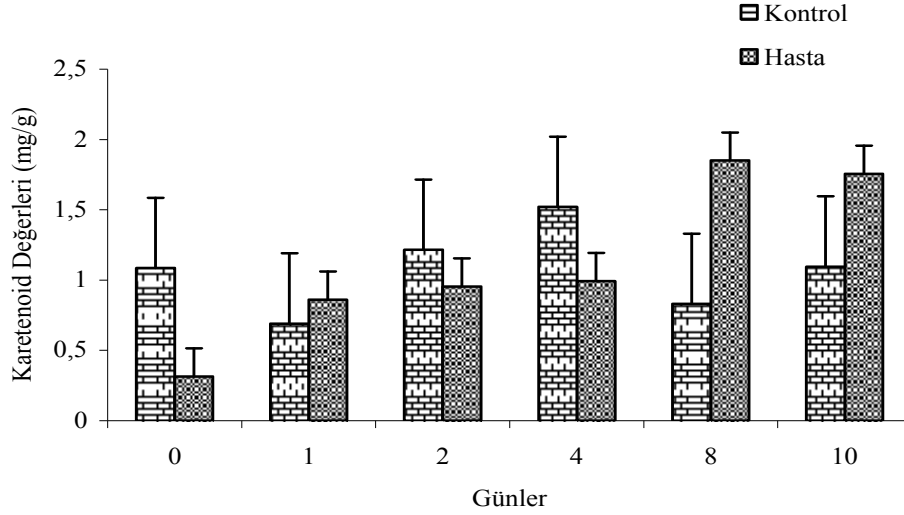
P. syringae pv. *tomato* bakterisinin sebep olduğu hastalığın toplam karetenoid miktarı üzerindeki etkisine ilişkin sayısal değerler Çizelge 4.3’de, grafiğe ait değerler ise Şekil 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerindeki toplam karetenoid değerleri

Gruplar	Toplam Karetenoid Değerleri (mg/g)					
	0.Gün $\bar{x} \pm SEM$	1.Gün $\bar{x} \pm SEM$	2.Gün $\bar{x} \pm SEM$	4.Gün $\bar{x} \pm SEM$	8.Gün $\bar{x} \pm SEM$	10.Gün $\bar{x} \pm SEM$
Kontrol	1,085 ± 0,29	0,690 ± 0,0	1,215 ± 0,02	1,520±0,01	0,830 ± 0,0	1,095 ± 0,06
Hasta	0,315 ± 0,015	0,860 ± 0,07	0,955 ± 0,055	0,994±0,013	1,850 ± 0,12	1,755± 0,20

Aşılamanın yapıldığı ilk günden (0. gün) itibaren toplam karetenoid miktarının, toplam klorofil miktarına paralel olarak, 0. günde kontrol bitkisine oranla hasta bitkide azaldığı, 1. günde ise hasta bitkide kontrol bitkisine oranla arttığı görülmüştür. 2. ve 4.

günlerde hasta bitkilerin toplam karetenoid miktarının kontrol bitkilerine kıyasla azaldığı, 8. ve 10 günlerde ise hasta bitkilerin toplam karetenoid miktarlarının kontrol bitkisi ile karşılaştırıldığında arttığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.3. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerindeki toplam karetenoid düzeyleri.

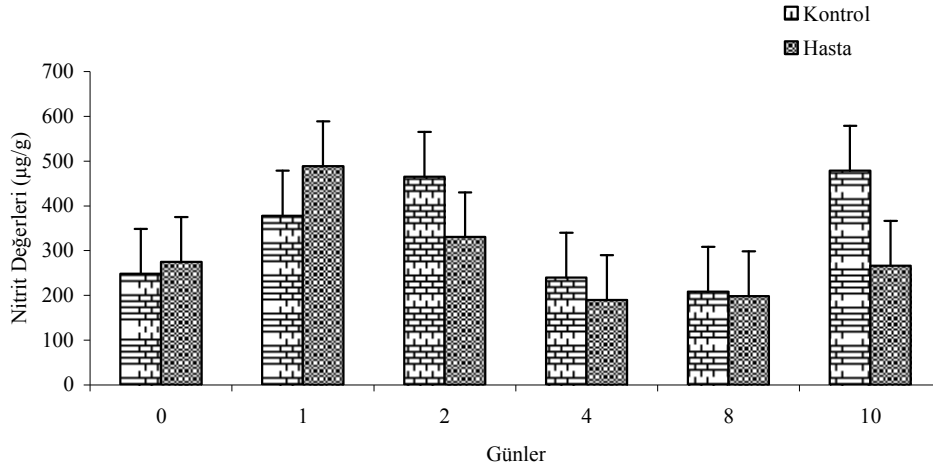
4.3. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerindeki Nitrit-Nitrat Düzeylerine İlişkin Bulgular

4.3.1. Nitrit değerleri üzerine etki

Yapılan çalışmada *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerinin nitrit seviyesi üzerinde gösterdiği etkiye ait sayısal değerler Çizelge 4.4’de sonuçlara ilişkin grafik ise Şekil 4.4’de verilmiştir. Değerler incelendiğinde 0. ve 1. günde kontrol bitkisinin hasta bitkiden az nitrit seviyesine sahip olduğu, 2. gün kontrol bitkisinin nitrit seviyesinin hasta bitkiden fazla olduğu, 4., 8. ve 10. günlerde ise hasta bitkilerin nitrit seviyelerinin kontrol bitkilerine oranla düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerindeki nitrit düzeyleri

Gruplar	Nitrit Değerleri (µg/g)					
	0.Gün	1.Gün	2.Gün	4.Gün	8.Gün	10.Gün
	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$
Kontrol	248,30± 1,67	378,30±2,33	465,00 ± 6,72	239,95 ± 1,65	208,30 ± 2,67	477,95 ± 2,05
Hasta	274,95± 2,66	488,30 ± 2,33	329,95 ± 5,16	189,95 ± 1,65	198,30 ± 2,10	266,60 ± 1,51

Şekil 4.4. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerindeki nitrit düzeyleri.

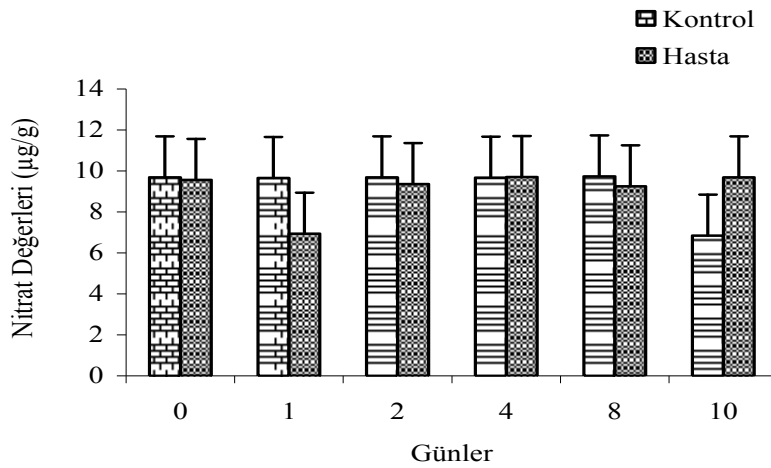
4.3.2. Nitrat değerleri üzerine etki

Domates bitkilerinin *P. syringae* pv. *tomato* ile aşılamanın ardından bitkilerin nitrat seviyelerindeki değişime ait sayısal değerler Çizelge 4.5’de, aynı sonuçlara ilişkin grafik ise Şekil 4.5’de verilmiştir. Elde edilen değerler incelendiğinde 0. günde kontrol bitkisinin hasta bitkiden fazla nitrat seviyesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin hasta edilmesinden 24 saat sonra (1. gün), hasta bitkinin nitrat oranının kontrole oranla azaldığı görülmüştür. 2. ve 8. günlerde kontrol bitkisinde hastaya oranla nitrat

seviyesinin yüksek olduğu, 4. ve 10. günlerde ise hasta bitkinin kontrol bitkisine kıyasla daha fazla nitrat içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerindeki nitrat düzeyleri

Gruplar	Nitrat Değerleri ($\mu\text{g/g}$)					
	0.Gün	1.Gün	2.Gün	4.Gün	8.Gün	10.Gün
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
Kontrol	484,5 \pm 0,005	483,0 \pm 0,005	484,5 \pm 0,015	484,0 \pm 0,015	486,5 \pm 0,02	342,0 \pm 0,02
Hasta	478,5 \pm 0,015	348,0 \pm 0,055	468,0 \pm 0,030	485,5 \pm 0,020	462,5 \pm 0,315	484,5 \pm 0,03



Şekil 4.5. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerindeki nitrat düzeyleri.

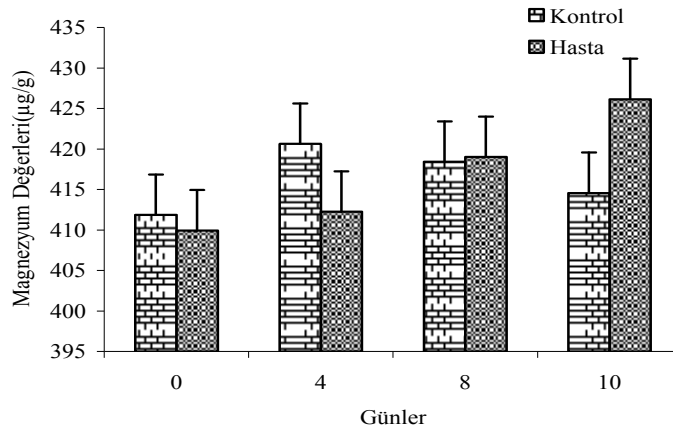
4.4. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerindeki Magnezyum (Mg) ve Mangan (Mn) Düzeylerine İlişkin Bulgular

Yapılan uygulamada *P. syringae* pv. *tomato* ile hasta edilen domates bitkileri ve kontrol bitkilerine ait hastalık sonrası Mg ve Mn elementlerinin miktarlarındaki değişimlere ait sayısal değerler Çizelge 4.6'da, aynı değerlere ait grafikler ise Şekil 4.6

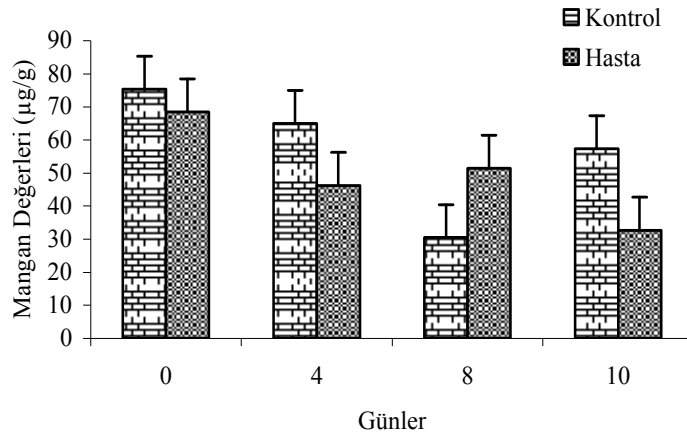
ve Şekil 4.7’de verilmiştir. Uygulama sonucu elde edilen değerler incelendiğinde bakterinin aşılacağı ilk günde (0. gün) kontrol bitkilerinde, Mn ve Mg elementlerinin seviyesinin hasta bitkilere oranla kontrol bitkilerinde yüksek olduğu saptanmıştır. Dördüncü günde Mg ve Mn elementlerinin seviyesinin kontrol bitkilerinde hasta bitkilerden daha yüksek olduğu görülmüştür. 8. günde Mg ve Mn miktarlarının hasta bitkilerde yükseldiği tespit edilmiştir. Örneklerin alındığı son günde (10.gün) ise Mg elementinin hasta bitkilerdeki seviyesinin arttığı, Mn elementinin miktarının ise kontrol bitkisinde hasta bitkiden fazla olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerindeki Mg ve Mn düzeyleri

Gruplar	0. Gün $\bar{x} \pm SEM$	4.Gün $\bar{x} \pm SEM$	8.Gün $\bar{x} \pm SEM$	10.Gün $\bar{x} \pm SEM$
Mg ($\mu\text{g/g}$)				
Kontrol	411,86 \pm 12,24	420,61 \pm 20,97	418,42 \pm 18,25	414,57 \pm 20,31
Hasta	409,92 \pm 10,94	412,27 \pm 25,39	419,00 \pm 25,63	426,15 \pm 9,33
Mn ($\mu\text{g/g}$)				
Kontrol	75,38 \pm 42,62	64,98 \pm 30,26	30,49 \pm 0,57	57,32 \pm 32,52
Hasta	68,48 \pm 25,01	46,25 \pm 31,06	51,41 \pm 27,96	32,69 \pm 15,61



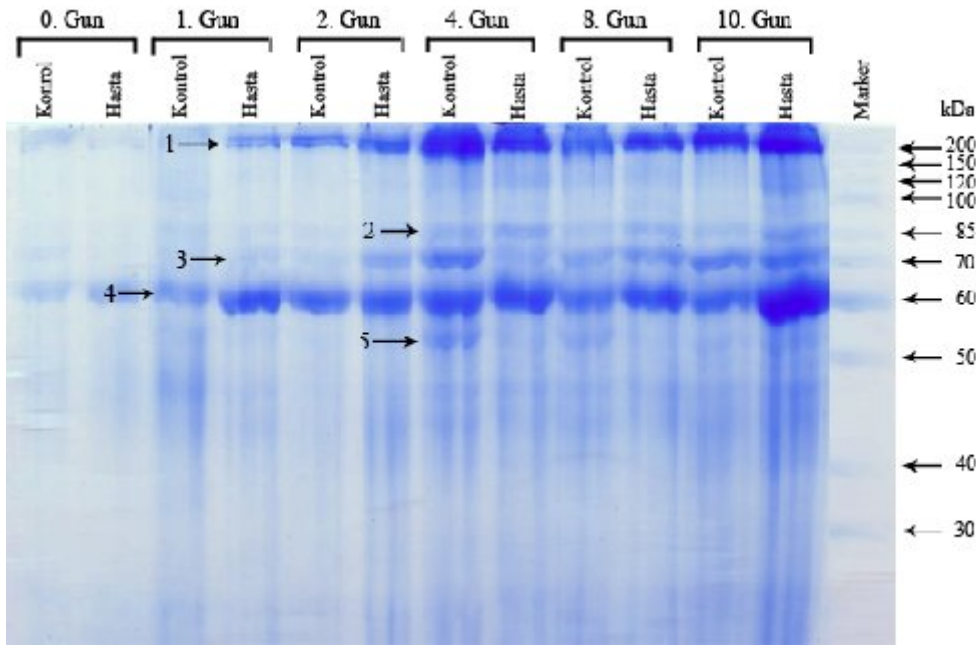
Şekil 4.6. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerindeki Mg düzeyleri.



Şekil 4.7. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerindeki Mn düzeyleri.

4.5. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerinin Protein Profillerine İlişkin Bulgular

Araştırmada hastalık bulaştırılan domates bitkilerine ve kontrol bitkilerine ait protein profilleri sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezde (SDS-PAGE) yürütülmüştür. İncelenen örneklerin protein profilleri Şekil 4.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında hasta ve kontrol bitkilerin protein profilleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Yapılan inceleme 1 olarak işaretlenmiş proteinin 204.6 kDa ağırlığına sahip olduğu ve örneklerin alındığı günler ilerledikçe miktarının arttığı görülmüştür. 2 ve 5 (90.3 kDa ve 54.3 kDa) numaralı bantlar dördüncü günde belirginliğinin arttığı gözlenmiştir. 3 numaralı bant 79.4 kDa ağırlığında olup örneklerin alındığı birinci günde belirginleşmiş ve günler ilerledikçe yoğunluğu aynı oranda artmıştır. 4 numaralı bandın ise 69.9 kDa ağırlığında olup 0. günden başlayarak yoğunluğunun her geçen gün daha da arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.8 *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış ve uyarılmamış domates fidelerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri.

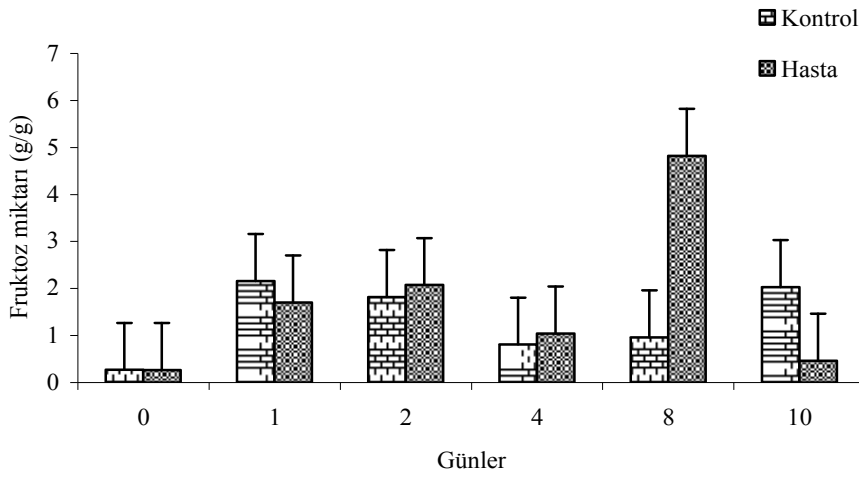
4.6. Patojen İle Uyarılmış Domates Fidelerinin Şeker Düzeylerine İlişkin Bulgular

4.6.1. Patojen ile uyarılmış domates fidelerinin fruktoz düzeyleri

Yapılan incelemede hasta ve kontrol bitkilerinin fruktoz miktarlarına ait sayısal değerler Çizelge 4.7’de aynı değerlere ait grafik Şekil 4.10’da verilmiştir. Fruktoz miktarının, hastalığın bulaştırıldığı ilk gün (0. gün) hasta ve kontrol grubunda yaklaşık olarak aynı değerde olduğu saptanmıştır. Hastalığın bulaşmasından yirmi dört saat sonra (1. gün) kontrol bitkisinin hasta bitkiden fazla miktarda fruktoz içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. İkinci günden itibaren onuncu güne kadar hasta bitkinin fruktoz miktarının kontrol bitkisine kıyasla arttığı ve en büyük farkın sekizinci günde ortaya çıktığı görülmüştür. Onuncu günde ise kontrol bitkisinin fruktoz miktarının hasta bitkiye oranla yeniden arttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerinin fruktoz düzeyleri

Gruplar	Fruktoz Değerleri (g/g)					
	0.Gün $\bar{x} \pm \text{SEM}$	1.Gün $\bar{x} \pm \text{SEM}$	2.Gün $\bar{x} \pm \text{SEM}$	4.Gün $\bar{x} \pm \text{SEM}$	8.Gün $\bar{x} \pm \text{SEM}$	10.Gün $\bar{x} \pm \text{SEM}$
Kontrol	0,2698 ± 0,4225	2,1570 ± 0,3307	1,8177 ± 0,2936	0,8075 ± 0,1337	0,9607 ± 0,1070	2,0287 ± 0,9795
Hasta	0,2669 ± 0,1938	1,7030 ± 0,2877	2,0740 ± 0,3052	1,0433 ± 0,1406	4,8217 ± 0,9396	0,4635 ± 0,3680

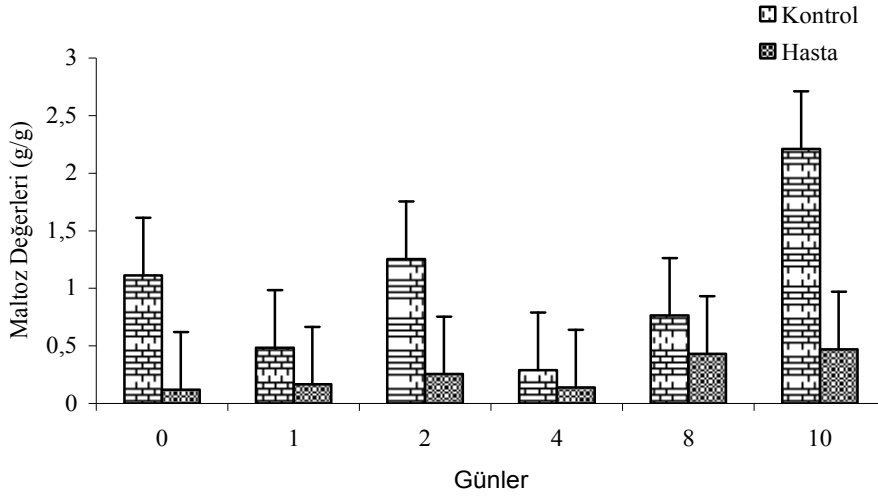
Şekil 4.9. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domates bitkilerinin fruktoz düzeyleri.

4.6.2. Patojen ile uyarılmış domates fidelerinin maltoz düzeyleri

Domates bitkilerine hastalık bulaştırılmasının ardından kontrol ve hasta bitki gruplarına ait sayısal değerler Çizelge 4.8’de aynı değerlere ilişkin grafik Şekil 4.11’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde maltoz miktarının hastalık bulaştırılmasının yapıldığı ilk günden (0. gün) başlayarak örneklerin alındığı son güne (10. gün) kadar kontrol bitkilerinin maltoz oranının hasta bitkilerin maltoz oranından yüksek olduğu ve en büyük farkın 10. günde ortaya çıktığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerindeki maltoz düzeyleri

Gruplar	Maltoz Değerleri (g/g)					
	0.Gün $\bar{X} \pm \text{SEM}$	1.Gün $\bar{X} \pm \text{SEM}$	2.Gün $\bar{X} \pm \text{SEM}$	4.Gün $\bar{X} \pm \text{SEM}$	8.Gün $\bar{X} \pm \text{SEM}$	10.Gün $\bar{X} \pm \text{SEM}$
Kontrol	1,1115 ± 0,10	0,484 ± 0,04	1,2545 ± 0,10	0,289 ± 0,02	0,7635 ± 0,07	2,2095 ± 0,02
Hasta	0,12 ± 0,01	0,1655 ± 0,02	0,2545 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,431 ± 0,03	0,47 ± 0,04



Şekil 4.10. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerindeki maltoz düzeyleri.

4.7. Patojen ile Uyarılmış Domates Fidelerinin Hormon Düzeylerine İlişkin Sonuçlar

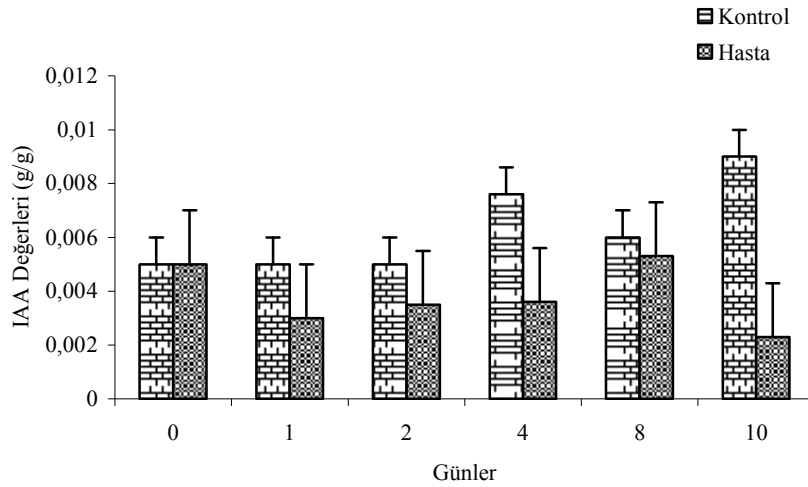
4.7.1. IAA miktarı üzerine etki

Yapılan araştırmada *P. syringae* pv. *tomato* bakterisi bulaştırılan hasta bitkiler ve kontrol bitkilerine ait IAA değerleri Çizelge 4.9'da aynı değerlere ilişkin grafik ise

Şekil 4.12’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde IAA miktarının hastalığın bulaştırıldığı ilk gün (0. gün) hasta ve kontrol bitkisinde eşit olduğu görülmektedir. Daha sonraki günlerde ise hasta bitkilerin IAA miktarının kontrol bitkilerinden düşük olduğu ve en büyük farkın örneklerin alındığı son gün olan 10. günde ortaya çıktığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerinin IAA düzeyleri

Gruplar	IAA Değerleri (g/g)					
	0.Gün $\bar{x} \pm SEM$	1.Gün $\bar{x} \pm SEM$	2.Gün $\bar{x} \pm SEM$	4.Gün $\bar{x} \pm SEM$	8.Gün $\bar{x} \pm SEM$	10.Gün $\bar{x} \pm SEM$
Kontrol	0,005 ± 0,0060	0,005 ± 0,0062	0,005 ± 0,0068	0,0076 ± 0,0006	0,006 ± 0,0059	0,009 ± 0,0010
Hasta	0,005 ± 0,0065	0,003 ± 0,0029	0,0035 ± 0,0004	0,0036 ± 0,0003	0,0053 ± 0,0040	0,0023 ± 0,0030



Şekil 4.11. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerinin IAA düzeyleri.

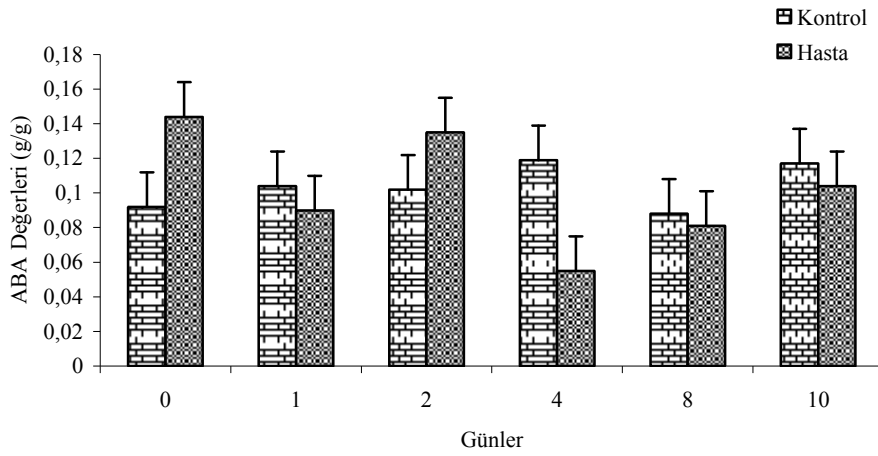
4.7.2. ABA miktarı üzerine etkisi

P. syringae pv. *tomato* bakterisinin sebep olduğu hastalığın domates bitkisinin ABA miktarı üzerindeki etkisine ilişkin bulunan sayısal sonuçlar Çizelge 4.10’da aynı sonuçlara ait grafik Şekil 4.13’de verilmiştir. Bulunan değerler incelendiğinde bakterinin bulaştırıldığı ilk günde (0. gün) hasta bitkinin ABA seviyesinin kontrol bitkisinden fazla olduğu görülmüştür. Örneklerin alındığı bir sonraki gün (1. gün) hasta

bitkinin ABA seviyesinde kontrol bitkisine oranla bir azalma görülmektedir. Uygulamanın ikinci gününde hasta bitkinin ABA miktarında tekrar artış tespit edilmiştir. Örneklerin alındığı diğer günlerde hasta bitkilerde ABA seviyesinin kontrol bitkilerine kıyasla azaldığı belirlenmiştir. ABA miktarının azaldığı günler arasında en büyük fark 4. günde ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.10: *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerinin ABA seviyeleri.

Gruplar	ABA Değerleri (g/g)					
	0.Gün $\bar{x} \pm SEM$	1.Gün $\bar{x} \pm SEM$	2.Gün $\bar{x} \pm SEM$	4.Gün $\bar{x} \pm SEM$	8.Gün $\bar{x} \pm SEM$	10.Gün $\bar{x} \pm SEM$
Kontrol	0,092 ± 0,001	0,104 ± 0,02	0,102 ± 0,0015	0,119 ± 0,016	0,088 ± 0,007	0,117 ± 0,002
Hasta	0,144 ± 0,002	0,09 ± 0,001	0,135 ± 0,002	0,055 ± 0,006	0,081 ± 0,009	0,104 ± 0,024



Şekil 4.12. *P. syringae* pv. *tomato* ile uyarılmış domates bitkilerinin ABA seviyeleri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Biotek Tohumculuğun Falcon tipi domates (*L. esculantum* Mill.) tohumları, Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Almanya) temin edilen *P. syringae* pv. *tomato* bakterisi ile hasta edilmiş ve hastalık sonrasında prolin, toplam klorofil, toplam karetenoid, nitrit-nitrat, iz element, protein, şeker ve hormon miktarlarında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

Bitkiler abiyotik ve biyotik stres ve hastalık durumunda farklı metabolik yollarını devreye sokarlar. Prolin birikmesi bu yollardan biridir. Prolin aminoasitinin stres durumunda indikatör olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Stres durumunda bitki yapraklarında prolinin birikmesi yavaş bir süreçtir. Son zamanlarda prolin içeriğinin artışının bitki strese girdikten 16-24 saat sonra algılandığı rapor edilmiştir (Claussen, 2005) Yaptığımız uygulamada hastalığın bulaştırıldığı ilk günden (0. gün) itibaren hasta bitkilerin yapraklarındaki prolin miktarının kontrol bitkilerinin prolin seviyesinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen bu bulgu Claussen ve ark. (2006) ve Claussen'in (2005) domates bitkisiyle yaptığı çalışmalarda elde ettiği verilerle ve Aspinall ve Paleg'in (1981) bildirdiği bulgularla paralellik göstermektedir. Ancak her türlü biyotik veya abiyotik stres durumlarında prolin artışının görülmesi her zaman beklenen bir durum değildir. Bitki strese toleransı farklı mekanizmaları kullanarak da gerçekleştirebilir.

Radwan ve ark. (2007), patojenlerin etkileri sonucu bitkinin fotosentez oranı, pigment içeriğinde azalma, çözünür şeker içeriği, nişasta birikiminin azalması ve solunum oranının artması gibi fizyolojik işlevlerinin etkilendiği rapor edilmiştir. Olea ve ark. (2004), patojenlerin bitkinin diğer işlevleri üzerindeki etkisi ne kadar az bilirse de fotosentez ve solunum gibi fizyolojik faaliyetleri üzerindeki etkisi iyi bilindiğini belirtmiştir. Çalışmamızda, *P. syringae* pv. *tomato* ile enfekte edilen domates fidelerinde 4. günden itibaren gün geçtikçe hastalıkla paralel olarak toplam klorofil oranının azaldığı görülmüştür. 0. gün ile 4. gün arasında ise bitkinin hastalığa uyum süreci içinde toplam klorofil değerlerinde bir düzensizlik gözlenmiştir. Toplam karetenoid oranlarında 0. günden 8. güne kadar kısmi bir artış görülürken bu günden itibaren belirgin bir şekilde arttığı ve 10. gün sonunda en yüksek değerine ulaştığı görülmüştür. Bu bulgular Olea ve ark. (2004) domates bitkisi üzerinde, Radwan ve ark. (2007) salatalık bitkisinde yaptıkları çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Prasad ve Chetty (2008) yapraklı sebzelerde yaptıkları çalışmada nitrat ve nitritin birçok bitkide bulunduğunu belirtmiştir. Ayrıca nitrat kirliliğinin ürünün büyümesini güçlendirmek için daha çok absorbe etme gereksiniminden doğduğunu belirtmiştir. Modolo ve arkadaşları (2006) *Arabidopsis thaliana* bitkisinde yaptıkları çalışmada bitkilerin karmaşık savunma mekanizmalarının yolu ile biyotik ve abiyotik streslere cevap verdiğini, bu mekanizmalar arasında NO'un patojen saldırısına direncin gelişmesi için başlıca sinyal olduğunu belirtmiştir. Yine aynı araştırmacılar NO sentezinin bitkilerde nitrat redüktaz enziminin aktivitesinin nitrit miktarını azaltmasına bağlı olduğunu bildirmiştir. Wang ve Higgins (2005) domates bitkisi ile *Colletotrichum coccodes* etkileşiminde hücre duvarı yapısında meydana gelen değişikliklerin NO, H₂O₂ ve O₂ tarafından düzenlendiğini belirtmiştir. Bizim çalışmamızda nitrit miktarının hastalığın bulaştırılmasını takip eden günlerde kontrol bitkilerine oranla azaldığı görülmüştür. Buna karşılık nitrat seviyesinde hastalığın bulaştırılması ile beraber birinci ve onuncu günler dışında fark görülmemiştir. Bizim sonuçlarımız, nitrat miktarının hasta bitkilerde çalışmanın birinci gününde azaldığını, onuncu günde ise hasta bitkinin nitrat seviyesinin kontrole kıyasla arttığını göstermiştir.. Bu bulgular daha önce yapılan çalışmalarla örtüşmektedir.

Cherian ve ark. (2007) domates bitkisi ile yaptıkları çalışmada Cd birikmesinin toksik etkisi olduğunu ve bu etki sonucunda oksidatif stres durumunun meydana geldiğini buna bağlı olarak da antioksidant savunma sistemin devreye girdiğini bildirmiştir. Bizim uygulamamızda ise Mg elementinin hastalık periyodu boyunca artış gösterdiği Mn elementinin ise hastalık periyodu süresince azaldığı görülmüştür. Hastalık sonrasında iz element miktarındaki değişimle ilgili yeterli çalışma bulunamamıştır.

Yapılan araştırmada SDS-PAGE jel elektroforezine ait bulgular Şekil 4.8'de verilmiştir. Çalışmamızda 1 numaralı bandın ağırlığının 204.6 kDa olduğu ve hastalığın bulaştırıldığı ilk günden itibaren bütün bitkilerde var olduğu ve örnek alınan günler ilerledikçe bant yoğunluğunun arttığı saptanmıştır. Bu bandın yapısal bir protein olduğu düşünülmektedir. 2 ve 5 numaralı bantların ağırlıkları 90.3 ve 54.3 kDa olduğu tespit edilmiştir. Bu iki bant örneklerin alındığı dördüncü günde tam olarak belirginleşmiş ve takip eden günlerde yoğunlukları artmıştır. 3 numaralı bant 79.4 kDa ağırlığında olup bitki hasta edildikten 24 saat sonra belirginleşmiş ve gün geçtikçe yoğunluğu artmıştır. 4 numaralı bandın ise 69.9 kDa ağırlığında olduğu ve 0. günden itibaren yoğunluğunun her geçen gün arttığı tespit edilmiştir. El-Hendway ve ark. (2007) domates bitkisi ile yaptıkları çalışmada, domates fidelerini *X. compestries* pv. *vesicatoria* ile hasta ettiklerinde bitkinin protein profilinde önemli bir artış olduğunu saptamıştır. SDS-PAGE analizi distile su ile muamele

edilen fidelerde 64.7 ile 17.47 kDa arasında değişen ağırlıklara sahip on iki bandın ortaya çıktığını, *X. compestries* pv. *vesicatoria* ile hasta edilen fidelerde ise 102.75 -15.01 kDa arasında ağırlığa sahip on beş protein bandı görüldüğünü bildirmiştir. Cömert (1994) yaptığı çalışmada *P. syringae* pv. *tomato* ile hasta ettiği Falkon tipi domates bitkilerinde SDS-PAGE analizi yapmış ve hastalık aşılmasından 7-9 gün sonra 18-24 kDa ağırlığına sahip iki protein bandı tespit etmiştir. Yine aynı çalışmada gerek virüs enfeksiyonu, gerek fungus ve bakteri ve gerekse abiyotik faktörlerle uyarılan PR-proteinlerinin genelde konukçuya özgül olduğu ve küçük molekül ağırlığına (10-40 kDa arasında) sahip oldukları tespit edilmiştir. Khallal (2007) *Fusarium oxysporum* ile enfekte ettiği domates fidelerinde 65.0, 16.3 ve 12.5 kDa ağırlığına sahip protein bantlarının sağlıklı bitkide mevcutken hasta bitkilerde gözden kaybolduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamız bu çalışmalarla uygunluk göstermesine rağmen daha önceki çalışmalarda bahsedilen küçük molekül ağırlığına sahip protein bantları tespit edilememiştir. Bunun sebebinin ekstraksiyon yönteminden kaynaklanması muhtemeldir.

Çalışmamızda incelenen fruktoz miktarının hastalığın bulaştırıldığı ve örneklerin alındığı ilk gün (0. gün) ve birinci gün hasta bitkilerin fruktoz oranının kontrol bitkilerinden düşük olduğu görülmüştür. Fakat örneklerin alındığı ikinci gün hasta bitkilerin fruktoz seviyesinin kontrole kıyasla artmaya başladığı, bu artışın 10. güne kadar devam ettiği saptanmıştır. Özellikle 8. günde büyük bir fark oluştuğu tespit edilmiştir. 10.günde ise, hasta bitkinin fruktoz miktarının tekrar azaldığı gözlenmiştir. Maltoz miktarının bakterinin aşılacağı ilk günden itibaren kontrol bitkilerinde hasta bitkilerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hastalığın ilerlemesine paralel olarak bir artış olmasına karşın kontrol bitkisinin seviyesine yaklaşamamıştır. Kontrol ve hasta bitkiler arasındaki maltoz seviyesindeki en büyük fark ise 10. günde ortaya çıkmıştır. Bu durum klorofil ve karetenoid miktarları ile paralellik göstermektedir. Şekerler yüksek bitkilerin gelişme sürecinde önemli düzenleyici bir rol oynar. Wingler ve Roitsch (2008) yaptıkları çalışmada bakteri, fungus ve herbisid bulaşmasında ya da gal oluşumunu sağlayan böceklerin şeker durumunu, primer karbon mekanizmasını ve düzenleyici bitki hormonlarının kararlı seviyesini değiştirerek yaprak senesensini etkileyebileceğini bildirmiştir. Yine aynı araştırmacılar çalışmalarında şeker ve hormon sinyalleri arasındaki etkileşimin abiyotik stres durumunda daima önemli bir rol oynadığını belirtmiştir. Yaprak senesensinin metabolik düzenlenmesi uzun süre bilim adamlarının ilgisini çekmiştir. Bildirilen bir hipoteze göre senesens fotosentezin bozulması sonucunda fotosentetik metabolitlerin azalmasına bağlıdır bu azalma senesensi aktive edebilir (Hensel ve ark., 1993). Öyleki yapraklardaki aminoasit içeriği bozulurken (Masclaux ve ark., 2000; Jongebloed ve ark., 2004), birkaç bitki türünde şeker içeriği artış göstermiştir (Nooden

ve ark., 1997). Örneğin, *Arabidopsis*'te heksoz glukoz ve fruktoz içeriği ölen yapraklarda şiddetli şekilde yükselirken, sukroz içeriği daha karardır. (Quirino ve ark., 2001; Stessman ve ark., 2002; Diaz ve ark., 2005; Pourtau ve ark., 2006; Wingler ve ark., 2006).

IAA miktarının hastalığın bulaştırıldığı ilk gün (0. gün) hasta ve kontrol bitkisinde eşit olduğu görülmektedir. Daha sonraki günlerde ise hasta bitkilerin IAA miktarının kontrol bitkilerinden düşük olduğu fakat 1. günden itibaren orantılı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kontrol ve hasta bitkilerin IAA miktarı arasındaki en büyük farkın örneklerin alındığı son gün olan 10. günde ortaya çıktığı belirlenmiştir. Hastalığın 1. günden sonra IAA miktarındaki belirgin artış stresin tetiklediği IAA biyosentezinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca IAA ve oksin türevlerinin bitki yaprak gelişimini düzenlemek ve iç dengenin sağlanması için arttırıldığı bilinmektedir (Quin ve ark., 2005). Pan ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada yaralanma ve patojen enfeksiyonunun IAA'nın parçalanması sonucu oluşan bir metabolit olan indol-3-karboksilik asitin (ICA) artışını önemli derecede uyardığını ve ICA'nın ve onun türevlerinin büyük artışı ve IAA birikmesinin, IAA sentezini ve azalmasını tetikleyen büyük bir stres varlığını önerir, ve/yada ICA'nın IAA'dan bağımsız büyük bir yapımı olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada *Botrytis cinerea* ile enfekte edilen bitkilerde, enfeksiyondan 24 saat sonra ICA seviyesinin IAA seviyesinden yaklaşık yirmi kat yüksek olduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte bitkinin bir iğne yardımı ile yaralanmış ve bu olaydan 1 saat sonra yapılan analizde ICA seviyesinin beş kat arttığı fakat IAA seviyesinin değişmediği görülmüştür.

Yapılan uygulamada bakterinin bulaştırıldığı ilk günde (0. gün) hasta bitkinin ABA seviyesinin kontrol bitkisinden fazla olduğu görülmüştür. Örneklerin alındığı bir sonraki gün (1. gün) hasta bitkinin ABA seviyesinde kontrol bitkisine oranla bir azalma görülmektedir. Uygulamanın ikinci gününde hasta bitkinin ABA miktarında tekrar artış tespit edilmiştir. Örneklerin alındığı diğer günlerde hasta bitkilerde ABA seviyesinin kontrol bitkilerine kıyasla azaldığı belirlenmiştir. ABA miktarının azaldığı günler arasında en büyük fark 4. günde ortaya çıkmıştır. Hasta bitkilerdeki ABA seviyeleri incelendiğinde hastalığın ilk günlerindeki artışın hastalığa adaptasyon veya genetik düzenleme için miktarın yükseldiği 4. günden sonra meydana gelen azalma için ise hastalığa uyumun sağlanmasından kaynaklandığı yorumu yapılabilir. Mauch-Mani ve Mauch (2005) yaptıkları çalışmada ABA artışının bitki için membranal koruma sağlayabileceğini belirtmiştir. ABA'nın patojen sinyal yollarını uyarma, stomal düzenleme ve gelişimsel denge gibi birçok fizyolojik etkisi olmakla birlikte, ABA seviyesinin bu farklı etkilerinin SA ve JA gibi diğer düzenleyici bileşiklerle olan oranına da bağlı olduğunu belirtmiştir. ABA fide olgunlaşması, dormansi ve bitkinin çeşitli çevresel

streslere adaptasyonunda zorunludur (Wan ve Li, 2006). Hormonların her bir sınıfının biyolojik etkileri karakterize edilirken, çok yönlü bitki hormonları sıklıkla gelişmeye ve stres cevabına katılan sinerjistik ya da antagonistik etkili kimyasal maddelerdir. Oksin-sitokinin-etilen miktarlarının karışması organ gelişmesinde (Aloni ve ark., 2006), ABA-GA (Gazzarina ve McCourt, 2001) ve JA-SA-ET (Reymond ve Farmer,1998) ve ABA-JA (Ho ve ark., 2003) biyotik ve abiyotik streslere cevapta etkili olduğu bildirilmiştir (Nemhauser ve ark., 2006).

Bu çalışmada, özellikle Mn miktarının enfeksiyonun 8. ve 10. günlerinde çok önemli düzeylerde düşmesine karşın, Mg seviyesinin ise buna paralel olarak azalması oldukça anlamlı bulunmuştur. Bu durum, enfeksiyona bağlı olarak toplam klorofil miktarının düşmesi ve toplam karetenoid düzeylerinin artmasıyla da paralellik göstermektedir. Ayrıca, maltoz düzeyinde fruktoz lehine bir azalma söz konusudur. Muhtemelen patojenin etkisiyle domates fidelerinde aktif hale geçen invertaz enzimleri disakkaritleri monosakkaritlere parçalanmış olabilir ve bu da patojenin karbon kaynağı elde etmesine katkıda sağlayabilir. Bulgularımız bakteri ile enfekte edilen domates bitkilerinde serbest L-prolin birikmesinin yükseldiğini göstermektedir. Patojen bulaştırılması ile kontrol grubuna kıyasla hasta domates bitkisinde nitrit içeriği 0. ve 1. günde yüksek olduğu halde, nitrat değerleri 0. ve 1. günde hasta bitkilerde düşük bulunmuştur. Nitrat değerlerinin hasta grupta 10. günde ölçülen 9.96 µg/ml değerine rağmen, nitrit değerleri aynı gün hasta bitkide 266.6 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Diğer taraftan, toplam hücre proteinlerinin SDS-poliakrilamid jel desenleri 69.9 kDa'luk proteinin hasta ve kontrol grubu domates bitkilerinde (2., 4., 8. ve 10. günlerde) önemli derecede arttığını ve 54.3 kDa ağırlığındaki proteinin yalnızca 8. ve 10. günlerde kontrol bitkilerde bulunduğu belirlenmiştir. Bulgularımız hasta bitkilerde 0. ve 2. günlerde absisik asit (ABA) seviyesinin kontrol grubu ile hasta bitkiler kıyaslandığında, diğer günler hariç, önemli oranda arttığını ortaya koydu (yaklaşık olarak 0.144 g/ml ve 0.135 g/ml). Diğer taraftan, indol-3 asetik asit (IAA) ölçümü yapılan bütün günlerde kontrolle hasta bitkiler kıyaslandığında hasta domates bitkilerinde önemli derecede (0.003-0.005 g/ml) azaldığı ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada elde edilen bulgular konakçı bitki ve patojen arasındaki ilişkilerin açıklanmasına önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Abramovitch, R. B., Martin, G. B., 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:356-364.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C. I., 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation lateral root initiation root apical dominance and root gravitropism. *Annual Bot.* 97:883-893.
- Anderson, A. J., Meyer, D. R., Meyer, F. K., 1973. Heavy metal toxicities: levels of nickel, cobalt and chromium in the soil and plants associated with visual symptoms and variation in growth of an oat crop. *Aust. J. Agric. Res.* 24:557-571.
- Anderson, J. P., Badruzsaufari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., Maclean, D. J., Kazan, K., 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16:3460-3479.
- Aspinall, D., Paleg, L. G., 1981. **Proline accumulation: physiological aspects, in: Paleg, L. G., Aspinall, D. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, Academic Pres, Sydney. pp:205-241.**
- Banowetz, G. M., 1994. Immunoanalysis of Cytokinins. *Cytokinins*. (Editors: Mok, D. W. S., Mok, M. C.) CRC Press, London. 305-315.
- Barzic, M. R., 1999. Persicomycin production by strains of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*. *Physiol. and Mol. Plant Patholog.* 55:243-250.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D., 1973. Rapid determination of free prolin for water stress studies. *Plant Soil.*, 39:205-207.
- Battal, P. ve Tileklioğlu, B., 2001. The effects of different mineral nutrients on the levels of cytokinins in Maize (*Zea mays* L.). *Turk. J. Bot.* 25:123-130.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R. Ve Dangl, J. L., 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:391-399.

- Bender, C. L., 1999. Chlorosis-inducing phytotoxins produced by *P. syringae*. ***European Journal of Plant Pathology*. 105:1-12.**
- Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F., Gross, D. C., 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. ***Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 63:266-292.**
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Schell, D., 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. ***Plant Physiol.* 126:1196-1204.**
- Bostock, R. M., 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. ***Physiological and Molecular Plant Patholog.* 55:99-109.**
- Bowen, H. J. M., 1979. ***Environmental Chemistry of the Elements***. Academic Press, London, 237 pp.
- Bowling, S. A., Clarke, J. D., Klessig, D. F., Dong, X., 1997. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. ***Plant Cell.* 9:1573-1584.**
- Brenner, M. L., 1981. Modern methods for plant growth substance analysis. ***Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32:511-538.**
- Bryant, J. P. , Chapin, F. S. ve Klein, D. R., 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. ***Oikos* 40:357-368.**
- Buschbell, T. ve Hoffman, G. M., 1992. The effects of different nitrogen regimes on the epidemiologic development of pathogens on winter-wheat and their control. ***J. Plant Dis. Prot.* 99:381-403.**
- Carballo, S. J., Blankenship, S. M. ve Sanders, D. C., 1994. Drip fertigation with nitrogen and postharvest susceptibility to bacterial soft rot of bell peppers. ***J. Plant Nutr.* 17:1175-1191.**
- Chamberlain, J., 1995. ***The Analysis of Drugs in Biological Fluids*** (Second Edition). CRC Press, New York. 139-145.
- Chatterjee, J., Chatterjee, C., 2003. Management of phytotoxicity of cobalt in tomato by chemical measures. ***Plant Science.* 164:793-801.**
- Cheik, N., Jonmes, R. J., 1994. Disruption of maize kernel growth and development by heat stress. ***Plant Physiol.* 106:45-51.**

- Chen, W. S., 1991. Changes in cytokinins before and during early flower bud differentiation in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Plant Physiol.* **96**:1203-1206.
- Chung, E., Park, J. M., Oh, S. K., Joung, Y. H., Lee, S., Choi, D., 2004. Molecular and biochemical characterization of the *Capsium annuum* calcium-dependent protein kinase 3 (CaCDPK3) gene induced by abiotic and biotic stresses. *Planta.* **220**:286-295.
- Claussen, W., 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci.* **168**:241-248.
- Claussen, W., Brückner, B., Krumbein, E., Lenz, F., 2006. Long-term response of tomato plants to changing nutrient concentration in the root environment-the role of proline as an indicator of sensory fruit quality. *Plant Science.* **171**:323-331.
- Corne, M. J., Jurrion, T., Van Lonn, L. C., 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boos or burden? *Ag. Biotech. Net.* **3**:1-7.
- Cömert, M., 1994. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ile uyarılan domatesdeki patojenezle ilgili proteinler. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Crawford, N. M., Glass, A. D. M., 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science.* **3**:389-395.
- Cutting, J. G. M., 1991. Determination of the cytokinin complement in healthy and witchesbroom malformed protease. *J. Plant Growth Regul.* **10**:85-89.
- Davies, P. J., 1995. The plant hormones; Their nature, occurrence and functions. *Plant Hormones* (Editor: Davies P.J.) Kluwer Academic Publishers, Boston. pp. 1-39.
- Delauney, A. J., Verma, D. P. S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal.* **4**:215-223.
- Diaz, C., Purdy, S., Christ., A., Morot-Gaydry, J. F., Wingler, A., Masclaux-Daubresse, C., 2005. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaves senescence in *Arabidopsis thaliana*: a metabolic profiling approach. *Plant Physiology.* **138**:898-908.
- Doares, S. H., Narvaez-Vasquez, J., Ryan, C. A., 1995. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **108**:1741-1746.

- Doherty , H. M., Selvendran , R. R., Bowles , D. J., 1988. The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. ***Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33:377-384.**
- El-Hendway, H. H., Osman, E. M., Sorour, N. M., 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. ***Microbiological Research.* 160:343-352.**
- El-Khallal, S. M., 2007. Induction and Modulation of Resistance in Tomato Plants Against *Fusarium* Wilt Disease by Bioagent Fungi (Arbuscular Mycorrhiza) and/or Hormonal Elicitors (Jasmonic Acid & Salicylic Acid): 2-Changes in the Antioxidant Enzymes, Phenolic Compounds and Patojen Related-Proteins. ***Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 1:717-732.**
- Ellis, J. ve Dodds, P., 2003. Plant Pathology: Monitoring a pathogen-targeted host protein. ***Current Biology.* Vol 13:400-402.**
- Engelhard, A. W., 1989. ***Management of Diseases with Macro and Microelements.*** American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn., USA. p.217.
- Fabro, G., Kovacs, I., Pavet, V., Szabados, L., Alvarez M. E., 2004. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. ***The American Phytopathological Society. MPMI* vol. 17 no:4, pp 343-350.**
- Featonby-Smith, B. C., Van Staden, J., 1984. Identification and seasonal variation of endogenous cytokinins in *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenf. ***Botanica Marina.* 27:527-531.**
- Feys, B. J., Parker ,J. E., 2000. Interplay of signalling pathways in plant disease resistance. ***Current Opinion in Plant Biology.* 3:309-314.**
- Feys, B. J. F., Benedetti, C. E., Turner, J. G., 1994. *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. ***Plant Cell.* 6:751-759.**
- Fidantsef, A. L., Stout, M. J., Thaler, J. S., Duffey, S. S., Bostock, R. M., 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II , *Lycopersicon esculantum*. ***Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54:97-114.**

- Gazzarina, S., McCourt, P., 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signalling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**:387-391.
- Gholum, C., Foursy, A. and Fares, K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulatin in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany.* **47**:39-50.
- Gilmour, S. J., Aydrey, M. S., Salazar, M. P., Everard, J. D., Thomashow, M. F., 2000. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* **124**:1854-1865.
- Glazebrook, J., Chen, W. J., Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Metraux, J. P., Zhu, T., Katagiri, F., 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* **34**:217-228.
- Grote, D., Schmit, R., Claussen, W., 2006. Water uptake and proline index as indicators of predisposition in tomato plants to *Phytophthora nicotianae* infection as influenced by abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* **69**:121-130.
- Hansen, C. E., Venzler, H., Meins, F., 1984. Concentration gradient of trans-zeatin riboside and *trans*-zeatin in the maize stem. *Plant Physiol.*, **75**:959-963.
- Hare, P. D., Cress, A., Van Staden, J., 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stres-related signal transduction. *J. Exp. Bot.* **50**:413-434.
- Harms, K., Ramirez, I., Pena-Cortes, H., 1998. Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiol.* **118**:1057-1065.
- Herms, D. A., Matson, W. J., 1992. The dilemma of plants: to grow or to defense. *Quart. Rev. Biol.* **67**:283-335.
- Hernandez-Minea, F. M., 1991. Identification of cytokinins and the changes in their endogenous levels in developing *Citrus sinensis* leaves. *Journal of Horticultural Science.* **66**:505-511.

- Ho, T. D. H., Gomez-Cadenas, A., Zentella, R., Caseretto, J., 2003. Cross-talk between abscisic acid and gibberellins in barley aleurone layers. *J. Plant Growth Regul.* **22**:185-194.
- Hoffland, E., Jeger, M. J., Van Beusichem, M. L., 2000. Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant and Soil.* **218**:239-247.
- Hoffland, E., Van Beusichem, M. L., Jeger, M. J., 1999. Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant Soil.* **210**: 263-272.
- Horgan, R., 1988. *Hormone Analysis, In: Plant Hormones.* (Editor: Davies, J. D.) Kluwer Academic Publishers, London, 415-419.
- Horgan, R., Kramers, M. R., 1979. High-performance liquid chromatography of cytokinins. *Journal of Chromatography.* **173**:263-270.
- Huang, J., Cardoza, J. Y., Schmelz, E. A., Raina, R., Engelberth, J., Tumlinson, H. J., 2003. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plant in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta.* **217**:767-775.
- Huber, D. M., Watson, R. D., 1974. Nitrogen form and plant disease. *Ann. Rev. Plant Pathol.* **12**:139-165.
- İnceer, G., 1995. *Azot ve fosfor ile gübrelemenin domates bakteriyel leke hastalığı (Pseudomonas syringae pv tomato) üzerine etkisi.* Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Ankara.
- Karkacier, M., Erbas, M., Uslu, M. K., Aksu, M., 2003. Comparison of Different Extraction and Detection Methods for Sugars Using Amino-Bonded Phase HPLC. *Journal of Chromatographic Science.* **41**:331-333.
- Keskin, G., Gül, U., 2004. Domates. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü. Sayı 5. Nüsha 13.*
- Kloek, A. P., Verbsky, M. L., Sharma, S. B., Schoolz, J. E., Vogel, J., Klessig, D. F., Kunkel, B. N., 2001. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coil) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J.* **26**:509-522.
- Koshimizo, K., Iwamura, H., 1986. *Cytokinins. Chemistry of Plant Hormones,* (Editor: Takahashi, N.), CRC Press Inc., Florida. 154-199.

- Kovac, M., Zel, J., 1994. The effect of aluminium on the cytokinins in the mycelia of *Lactarius piperatus*. *Planta Science*. **97**:137-142.
- Kozik, E. U., 2002. Studies on resistance to bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) in tomato cv. Ontario 7710. *Plant Breeding*. **121**:526-530.
- Kuraishi, S., Tasaki, K., Sakurai, N., Sadatoku, K., 1991. Changes in levels of cytokinins in etiolated squash seedlings after illumination. *Plant Cell Physiol*. **32** :585-591.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, T4. *Nature*, **227**:680-685.
- LeNoble, M. E., Spollen, W. G., Sharp, R. E., 2004. Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *J. Exp. Bot.* **55**:237-245.
- Leon, P., Sheen, J., 2003. Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* **8**:110-116.
- Lucas, J. A., 1998. *Plant Pathology and Plant Pathogens, 3rd edn*. Blackwell Science, Oxford.
- Ludwig, A. A., Romeis, T., Jones, J. D. G., 2004. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J. Exp. Bot.* **55**:181-188.
- Machackova, I., Krekule, J., Eder, J., Seidlova, F., Strnad, M., 1993. Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. *Physiologia Plantarum*, **87**:160-166.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., Dietrich, R. A., 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics*. **26**:403-410.
- Malolepsza, U., Rozalaska, S., 2005. Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance. Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in hydroxyethylrutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol Biochem*. **43**:623-635.
- Marschner, H., 1995. *Beneficial mineral elements in: Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, Harcourt Brace and Company, London, pp.405-435.

- Marschner, H., 1995. *Relationship between mineral nutrition and plant diseases and pests. In Mineral Nutrition of High Plants* Ed. H. Marschner. Academic Press, London, pp. 436-460.
- Mauch-Mani, B., Mauch, F., 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biol.* **8**:409-414.
- McDowell, J. M., Dangl, J. L., 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* **25**:79-82.
- Mitchell, R. E., 1991. Implications of toxins in the ecology and evolution of plant pathogenic microorganisms: bacteria. *Experientia.* **47**:791-803.
- Miteva, E., Hristova, D., Nenova, V., Maneva, S., 2005. Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. *Sci. Hortic.* **105**:343-358.
- Modolo, L. V., Augusto, O., Almeida, M. G. I., Pinto-Maglio, C. A. F., Oliveira, C. H., Seligman, K., Salgado, I., 2006. Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Science.* **171**:34-40.
- Mohamed, A. E., Rashed, M. N. and Mofty, A., 2003. Assessment of essential and toxic elements in some kinds of vegetables. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **55**:251-260.
- Money, P. A. ve Staden, J. V., 1984. Seasonal changes in the levels of endogenous cytokinins in *Sargassum heterophyllum* (Phaeophyceae). *Botanica Marina.* **17**:437-442.
- Moons, A., Prinsen E., Bauw, G., Van Montagu, M., 1997. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell.* **9**:2243-2259.
- Morris, J. W., Dumas, P., Morris, R., O., Zaer, J. B., 1990. Cytokinins in vegetative and reproductive buds of *Pseudotsuga menziesii*. *Plant Physiol.* **9**:67-71.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **461**:205-210.

- Nemhauser, J. L., Hong, F., Chory, J., 2006. Different plant hormones regulate similar processes through largely non-overlapping transcriptional responses. *Cell*. **126**:467-475.
- Nicholson, S. S., 2007. *Nitrate and nitrite accumulating plants*. Veterinary Toxicology. Edited by Ramesh, C. Gupta. ISBN: 978-0-12-370467-2. 876-879.
- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., Bowles D.J., 1996. Ethylene as signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*. **274**:1914-1917.
- Olea, F., Garcia, A. P., Canton, F. R., Rivera, M. E., Canas, R., Avila, C., Cazorla, F. M., Canovas, F. M., de Vicente, A., 2004. Up-regulation and localization of asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell Physiol*. **45**:770-780.
- Özcan, M. M. ve Akbulut, M., 2007. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plant use as spices, condiments and herbal tea. *Food Chemistry*. **106**:852-858.
- Palni, L. M. S., Susmons, R. E., Letham, D. S., 1983. Mass spectro analysis of cytokinins in plant tissues. *Plant Physiol*. **7**:858-863.
- Pan, X., Welti, R., Wang X., 2007. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*. **69**:1773- 1781.
- Peno-Cortes, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E. W., Willmitzer, L., 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*. **191**:123-128.
- Penninckx, I. A. M. A., Thoma, B. P. H. J., Buchala, A., Metraux, J. P., Broekaert, W. F. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defense in gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **10**:2103-2113.
- Perez-Alfocea, F., Estan, M. F., Caro, M., Guerrier, G., 1993. Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stres. *Physiol. Plant*. **87**:493-498

- 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., Klesslg, D. F., Martlenssen, O., Jensen, A. B., Mundy, J., 2000. *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. ***Cell***. **103**:1111-1120.
- Pozo, M. J., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., 2005. Jasmonetes-signals in Plant-Microbe interaction. ***J. Plant Growth Regul.*** **23**:211-222.
- Prasad, S., Chetty, A. A., 2008. Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. ***Food Chemistry***. **106**:772-780.
- Qamaruddin, M., 1996. Apperance of the zeatin riboside type of cytokinin in *Pinus sylvestris* seeds after red light treatment. ***Scand. J. For. Res.*** **6**:41-46.
- Qamaruddin, M., Dormling, I., Eliasson, L., 1990. Increase in cytokinin levels in scots pine in relation to chilling and bud burst. ***Physiologia Plantarum***, **79**:236-241.
- Quin, G., Gu, H., Zhao, Y., Ma, Z., Shi, G., Yang, Y., Pichersky, E., Chen, H., Liu, M., Chen, Z., Qu, L.J., 2005. An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates *Arabidopsis* leaf development. ***Plant Cell***. **17**:2693-2704.
- Radwan, D. M. E., Fayez, K. A., Mahmoud, S. Y., Hamad, A., Lu, G., 2007. Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. ***Plant Physiology and Biochemistry***. **45**:480-489.
- Reymond, P., Farmer, E. E., 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. ***Curr.Opin. Plant Biol.*** **1**:404-411.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E. E., 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. ***Plant Cell***. **12**:707-719.
- Roberts, J. A., Hooley, R., 1988. ***Plant Growth Regulators***. Blackie, London. 1-84.
- Roby, J. F., White, B. J., 1990. ***Biochemical Techniques Theory and Practica***. Waweland Press, Inc. 101-103.
- Rojó, E., Solano, R., Sanchez-Serrano, J. J., 2003. Interactions between signalling compounds involved in plant defense. ***Plant Growth Regul.*** **22**:82-98.
- Roosens, N. H., Willem, R., Li, Y., Verbruggen, I., Biesemans, M., Jacobs, M., 1999. Proline metabolism in the wild-type and in a salt-tolerant mutant of *Nicotiana*

- plumbaginifolia* studied by ^{13}C -nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol.* **121**:1281-1290.
- Sanderson, G. W., Cocking, E. C., 1963. Enzymic assimilation of nitrate in tomato plants. I. Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Physiology.* 416-422.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., Manners, J. M., 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:11655-11660.
- Sherif, M. K., Awadallah, R. M., Amsallah, A. H., 1980. Determination of trace elements of Egyptian crops by neutron activation analysis (III). *J. Radioanal. Chem.* **57**:53-60.
- Shoji, T., Nakajima, K., Hashimoto, T., 2000. Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **41**:1072-1076.
- Soejima, H., Sugiyama, T., Ishihara, K., 1992. Changes in cytokinin activities and mass spectrometric analysis of cytokinins in root exudates of rice plant (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.*, **94**:1724-1729.
- Staswick, P. E., Su, W., Howell, S. H., 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:6837-6840.
- Strizhov, N., Abraham, E., Ökrezs, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Konez, C., Szabados, L., 1997. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, AB11 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant. J.* **12**:557-569.
- Taylor, J. S., Thompson, B., Pate, S. J., Atkins, C. A., Pharis, R. P., 1990. Cytokinins in the phloem sap of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiol.*, **94**:1714-20.
- Thaler, J. S., Owen, B., Higgins, V. J., 2004. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol.* **135**:530-538.
- Toriye, E., Diez, C., Camara, M., Camacho, E., Mazairo, P., 1998. Influence of freezing Process on Free Sugars Content of Papaya and Banana Fruits. *J. Sci. Food Agric.*, **76**:315-321.

- Turnbull, C. G. N., Hanke, D. E., 1985. The control of bud dormancy in potato tubers. Measurement of the seasonal pattern of changing concentration of zeatin. *Planta*, **165**:366-376.
- Türkkan, M., Dolar, F. S., 2008. Fitotoxinlerin bitki hastalıklarındaki rolü. *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*. **14**:87-94.
- Tüzün, S., 2004. Dayanıksız bitkilerde hastalık etmenlerine karşı oluşan bağışıklık ve birden fazla dayanıklılık geni taşıyan bitkilerin dayanıklılık mekanizmaları arasındaki ilişkiler. *Turk J. Biochem.* **29**:1-176.
- Van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on the expression of the jasmonate-inducible gene *At-vsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* **41**:537-549.
- Verbruggen, N., Villarroel, R., Van Montagu, M., 1993. Osmoregulation of a proline-5-carboxylase reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **103**:771-781.
- Wan, X. R., Li, L., 2006. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by expression of a pea 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **347**:1030-1038.
- Wilkens, R. T., Spoerke, J. M., Stamp, N. E., 1996. Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology*. **77**:247-258.
- Xu, Y., Chang, P. F. L., Liu, D., Narasimhan, M. L., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*. **6**:1077-1085.
- Zhang, Y., Rowley, K. B., Patil, S. S., 1993. Genetic organization of a cluster of genes involved in the production of phaseolotoxin, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology*. **175**:6451-6458.
- Zurera, G., Estrada, B., Rineon, F., Pozo, R., 1987. Lead and cadmium contamination levels in edible vegetables. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **38**:805-812.

EKLER

EK -1. Bakterinin Geliştirilmesinde Kullanılan Besi yeri

1. King Agar B

King Agar B (Fluka)	33 g
Gliserol	10 ml
Damıtık su	990 ml

Besi yeri ve gliserol damıtık suda çözüldükten sonra 121°C’de 15 dakika sterilize edilir. 50°C’ye kadar soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür ve +4°C’de saklanır.

EK-2. Poliakrilamid Jel Elektrofrezde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

1. Akrilamid + N, N’-Metilen Bis-akrilamid Monomer Stoğu

Akrilamid (Merck)	28.8 g
Bis-akrilamid (Merck)	1.2 g

Maddeler gerekli miktarlar tartılıp 75 ml damıtık su içersinde çözümlenerek son hacim 100 ml’ye tamamlanır. Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede +4°C’de saklanır.

2. Ayırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCL, pH 8.6)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 8.6’ya ayarlanır. Son hacme tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve + 4°C’de saklanır. SDS-PAGE için %0.4 oranında SDS ilave edilir.

3. Yığma Jel Tamponu (0.5 M Tris-HCL, pH:6.8)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 6.8'e ayarlanır. Son hacme tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve +4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0.4 oranında SDS ilave edilir.

4. Koşturma tamponu

Trizma Bazı (Sigma)	1.21 g
Glisin (Merck)	5.76 g

Maddeler 1000 ml damıtık suda çözülür. SDS-PAGE için %0.1 oranında SDS ilave edilir.

5. Örnek tamponu (X4)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	5.12 ml
Gliserin (Merck)	8.00 ml
Damıtık su	3.00 ml
SDS	2.00 ml
2-β-merkaptöetanol	4.00 ml
Bromo fenol mavisi (Merck)	0.025 g

Gerekli miktarlar tartılıp temiz bir deney tüpü içerisinde homojen hale getirilir ve gün ışığına maruz bırakılmadan saklanır.

6. Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (Sigma)	1.5 g
İzopropil alkol (Merck)	250 ml
Asetik asit (Merck)	100 ml
Damıtık su	650 ml

Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

7. Boya Çıkarma Çözeltisi

İzopropil alkol (Merck)	250 ml
Asetik asit (Merck)	100 ml
Damıtık su	650 ml

Gerekli miktarlar tartılarak 650 ml damıtık suda çözülür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

8. Jel Saklama Çözeltisi

Jelleri saklamak amacıyla %7'lik glisial asetik asit çözeltisi kullanılır.

9. %10'luk Amonyum Per Sülfat (APS)

APS (Oxoid)	1 g
Damıtık su	10 ml

Gerekli miktarlar tartılarak damıtık suda çözülür ve +4°C saklanır. Bir haftadan sonra yeniden taze hazırlanarak kullanılır.

10. %10'luk SDS–PAGE Ayırıcı Jel İçeriği

Akrilamid/Bisakrilamid (Oxoid)	8.78 ml
Damıtık su	10.84 ml
1.5M Tris-HCL pH:8.6	6.58 ml
APS (Sigma)	125.00 µl
TEMED (Oxoid)	10.00 µl

Gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezin alt kısmına aktarılır.

11. %4'lük SDS–PAGE Yığıma Jel İçeriği

Akrilamid/Bisakrilamid (Oxoid)	0.81 ml
Damıtık su	2.95 ml
0.5 M Tris-HCL pH:6.8	1.235 ml
APS (Oxoid)	50.00 µl
TEMED (Oxoid)	6.00 µl

%10'luk SDS–PAGE polimerleştikten sonra, yukarıdaki maddelerden gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezde %10'luk SDS–PAGE kısmın üzerine aktarılır. Polimerleşme başlamadan en kısa zamanda hava boşluğu bırakılmadan tarak yerleştirilir.

EK -3. Prolin Analizinde Kullanılan Çözeltiler

1. % 40'lük Metanol Çözeltisi

40 ml metanol damıtık su ile 100 ml' ye tamamlanır.

2. Glasiyel Asetik Asit- Oto Fosforik Asit Çözeltisi

Glasiyel asetik asit 3:2 v/v oranında 6M orto fosforik asitle karıştırılır.

EK -4. Protein Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

1. QB Solüsyon

2M KPO ₄ (pH 7.8)	5 ml
0.5M EDTA	200 µl
Triton X-100	1 ml
%80' lik Gliserol	12.5 ml
Damıtık su	81.1 ml

Gerekli miktarlar 81.1 ml damıtık suda çözülür ve +4° C' saklanır.

2. 2 M KPO₄ (pH 7.8) Hazırlanışı

K ₂ HPO ₄	63.2 g
KH ₂ PO ₄	5 g

Gerekli miktarlar 200 ml damıtık suda çözülür ve pH' ı 7.82' e ayarlanır.

3. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA	46.52 g
------	---------

Gerekli miktar 250 ml damıtık suda çözülür ve 10 N NaOH kullanılarak pH 8.0' a ayarlanır.

1. 10 N NaOH pH

NaOH 100 g

Gerekli miktar 250 ml damıtık suda çözülür.

1. %80' lik Gliserol

% 100'lük Gliserol 80 ml

Gerekli miktar 100 ml damıtık suda çözülür.

EK -5. İz Element Tayininde Kullanılan Çözeltiler**1. Etil alkol Sülfürik asit karışımı**

Etil Alkol 95 ml

%5' lik H₂SO₄ 5 ml

95 ml etil alkol üzerine 5 ml H₂SO₄ ilave edilir.

2. 3 N HCl

HCl 24.68 ml

Gerekli miktar damıtık su ile 100 ml' ye tamamlanır.

EK -6. Nitrit-Nitrat Tayininde Kullanılan Çözeltiler**1. Sülfanilik Asit Çözeltisi**

600 mg sülfanilik asit 50 ml sıcak suda çözülür. Soğuduktan sonra üzerine 20 ml glasiyel asetik asit eklenir. Son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. Naftilamin Çözeltisi

20 mg naftilamin 20 ml glasiyel asetik asit ile çözülür ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

EK-7. Ekstraksiyon ve Saflaştırma İşleminde Kullanılan Çözeltiler**1. %80'lik metanol:**

Metanol (Merck)	80 ml
Saf su	20 ml

2. 01 M'lık KH_2PO_4 çözeltisi:

KH_2PO_4 (Merck)	1,3609 gr
Saf su	100ml

EK-8. Hormonların Analizinde Kullanılan Çözeltiler**1.% 80'lik metanol:**

Metanol (Merck)	80 ml
Saf su	20 ml

2. Hormon standartları:**2.1. IAA standardı:**

IAA (Merck)	40 µg
Saf su	50 ml

40 µg IAA standardı tartılır ve 50 ml saf suda çözülür.

2.2. ABA standardı:

ABA (Merck)	0.03 mg
Saf su	10 ml

0.03 mg ABA standardı 10 ml saf suda çözülür.

EK -9. Şeker Analizinde Kullanılan Çözeltiler**1. %80'lik metanol:**

Metanol (Merck)	80 ml
Saf su	20 ml

2. Şeker standartları:**2.1. Fruktoz standardı:**

Fruktoz (Sigma)	2 g
Saf su	100 ml

2 g. fruktoz standardı 100 ml saf suda çözüldü.

2.2. Maltoz standardı:

Maltoz (Sigma)	300 mg
Saf su	50 ml

300 mg maltoz standardı 50 ml saf suda çözüldü.

EK -10. Toplam Klorofil-Karetenoid Tayininde Kullanılan Çözeltiler**1. %80'lik Aseton çözeltisi:**

Aseton (Merck)	80 ml
Saf su	20 ml

80 ml asetona alınır hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

ÖZ GEÇMİŞ

Harun ÖNLÜ, 1981 yılında Erzincan'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Erzincan'da tamamladı. 2001-2002 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümüne kayıt yaptırdı. 2006 yılında adı geçen bölümden mezun oldu. Aynı yıl Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı.