

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİTKİ HASTALIKLARININ TESPİTİ İÇİN KALSİYUM SEÇİCİ SENSÖRLERİN
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

MUSTAFA NİĞDE

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. İBRAHİM İŞILDAK**

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ HASTALIKLARININ TESPİTİ İÇİN KALSİYUM SEÇİCİ SENSÖRLERİN
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa NİĞDE tarafından hazırlanan tez çalışması 27.11.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ünal ŞENEL
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ünal ŞENEL
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Prof. Dr. Mustafa CEMEK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mithat ÇELEBİ
Yalova Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Zafer Ömer ÖZDEMİR
Kırklareli Üniversitesi

Bu alışma, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün TAGEM-14/ARGE/05 numaralı projesi ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nn 2015-07-04-YL01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Hayatımın her anında maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK ve Yrd. Doç. Dr. Ünal ŞENEL'e, çalışma sırasında karşılaştığım sıkıntılarda bana destek olan Arş. Gör. İsmail AĞIR, Arş. Gör. Rıdvan YILDIRIM ve doktora öğrencisi Özlem TAVUKÇUOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Kasım 2015,

Mustafa NİĞDE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	3
1.3 Hipotez.....	3
BÖLÜM 2	
BITKİLER İÇİN KALSİYUMUN ÖNEMİ	4
2.1 Bitki Gelişiminde Kalsiyumun Önemi	4
2.2 Bitkilerde Kalsiyum Taşınımı.....	5
2.2.1 Hücre Dışı Kalsiyum Taşınımı.....	5
2.2.2 Hücre İçi Kalsiyum Taşınımı	7
2.3 Bitki Sinyal Yolaklarında Kalsiyum	13
BÖLÜM 3	
BITKİLERDE STRES VE BİTKİ HASTALIKLARINI TESPİT YÖNTEMLERİ.....	18
3.1 Bazı Önemli Abiyotik Stres Faktörleri.....	20
3.1.1 Tuzluluk	22
3.1.2 Yüksek Sıcaklık.....	24

3.1.3	Kuraklık.....	25	
3.2	Biyotik Stres ve Bitki İmmün Sistemi.....	27	
3.3	Bitki Hastalıklarının Belirtileri ve Hastalık Teşhis Yöntemleri.....	32	
3.3.1	Bitkilerde Hastalanma ve Hastalık Belirtileri.....	33	
3.3.2	Bitki Stres ve Hastalıklarının Tespit Yöntemleri	35	
BÖLÜM 4			
POTANSİYOMETRİK YÖNTEM VE İYON SEÇİCİ SENSÖRLER			39
4.1	Potansiyometrik Tayin ve Nernst Eşitliği	40	
4.2	Referans Elektrotlar	41	
4.3	İyon Seçici Elektrotlar	43	
4.4	İyon Seçici Elektrotlarda Performansın Değerlendirilmesi.....	45	
4.4.1	Seçicilik	45	
4.4.2	Cevap Zamanı	46	
4.4.3	Tayin Sınırı	46	
4.4.4	Doğrusal Çalışma Aralığı.....	47	
4.4.5	Kullanım Ömrü	47	
4.4.6	Tekrarlanabilirlik.....	47	
4.4.7	pH Çalışma Aralığı.....	47	
BÖLÜM 5			
MATERYAL VE METOD			49
5.1	Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Bitkiler.....	49	
5.2	Kullanılan Cihazlar	49	
5.3	DeneySEL Çalışma	50	
BÖLÜM 6			
SONUÇ VE ÖNERİLER			52
6.1	Elektrot Performansı.....	52	
6.1.1	Tayin Limiti	53	
6.1.2	Seçicilik Sabitleri	53	
6.1.3	Cevap Zamanı	55	
6.1.4	Doğrusal Çalışma Aralığı	55	
6.1.5	Tekrarlanabilirlik.....	56	
6.1.6	pH Çalışma Aralığı.....	57	
6.2	Bitkilerde Kalsiyum Takibi Sonuçları	58	
6.2.1	Soğuk Şoku	58	
6.2.2	Tuzluluk	59	
6.2.3	Kontrol.....	61	
6.3	Tartışma	62	
KAYNAKLAR			65
ÖZGEÇMİŞ			69

SİMGE LİSTESİ

$[Ca^{2+}]_{cyt}$	Sitozol Ca^{2+} konsantrasyonu
$[Ca^{2+}]_{vac}$	Vakuoler lümen Ca^{2+} konsantrasyonu
$[Ca^{2+}]_T$	Toplam kalsium miktarına göre konsantrasyon değeri
$[Ca^{2+}]_F$	Serbest Ca^{2+} konsantrasyonu
E	İndikatör elektrot potansiyeli
E°	Standart elektrot potansiyeli
R	Gaz sabiti
T	Sıcaklık
F	Faraday sabiti
a_x	Ölçülen iyonun aktivitesi
a_y	Girişim yapan iyonun aktivitesi
$k_{x,y}^{pot}$	Seçicilik katsayısı

KISALTMA LİSTESİ

ACA	Kalmodulin tarafından aktive edilen, kendiliğinden inhibe olan Ca ²⁺ /ATPaz
CAX	H ⁺ / Ca ²⁺ iyon değiştirici
CaM	Kalmodulin
CBL	Kalsinörin B benzeri proteinler
CDPK	Kalsiyuma bağımlı protein kinazlar
CNGC	Siklik nükleotid kapılı kanal
DACC	Depolarizasyonla aktive olan Ca ²⁺ kanalı
ECA	Endoplazmik retikulum tipi Ca ²⁺ /ATPaz
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent analizi
ETS	Efektör ile tetiklenen baskılama
FCM	Akış sitometrisi
FISH	Floresans in-situ hibridizasyon
GLR	Glutamat reseptör-benzeri kanal
HACC	Hiperpolarizasyonla aktive olan Ca ²⁺ kanalı
InsP ₃ R	İnositol 1,4,5-trisfosfat reseptör
KTpCIPB	Potasyumtetrakis(p-kloro)fenilborat
MCC	Mekanik duyarlı Ca ²⁺ kanalı
NAADPR	Nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat reseptör-benzeri kanal
NPOE	o-nitrofeniloktiletler
NSCC	Seçici olmayan katyon kanalı
PAMP	Patojen ilişkili moleküler yapılar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PRR	Patojen tanıyıcı reseptörler
PTI	PAMP ile tetiklenen immünite
PVC	Polivinilklorür
ROS	Reaktif oksijen türleri
RyR	Ryanodin reseptör
SV	Yavaş aktive olan vakuoler Ca ²⁺ kanalı
THF	Tetrahidrofur
VVCa	Vakuoler voltaj kapılı Ca ²⁺ kanalı

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Tipik bir bitki hücresi ve apoplast Ca^{2+} konsantrasyonları	8
Şekil 2.2 Bitki hücresinde pasif ve aktif Ca^{2+} taşınımının şematik gösterimi	9
Şekil 2.3 Bitkilerde Ca^{2+} /CaM aracılıklı sinyal ağı	16
Şekil 3.1 pH değişiminin bitki besin alımına etkisi	19
Şekil 3.2 Bitki tuz stresi ile ilgili olan biyokimyasal fonksiyonlar	24
Şekil 3.3 Kuraklık stresine karşı bitkinin gösterdiği davranışlar	27
Şekil 3.4 Bitkilerde patojenlerin bulaşma yollarına bir örnek	28
Şekil 3.5 Bitki immün yanıtının farklı yolları	29
Şekil 4.1 Bir potansiyometrenin çalışma prensibi	39
Şekil 4.2 Basit bir kalibrasyon grafiği	45
Şekil 4.3 Standart ekleme metodu ile iyon tayini	45
Şekil 5.1 Üretilen kalsiyum seçici elektrotlar	50
Şekil 5.2 Kaktüs bitkisine yerleştirilmiş kalsiyum seçici ve referans elektrotlar	51
Şekil 6.1 Özdeş elektrotlara ait potansiyel-zaman grafikleri	53
Şekil 6.2 Ölçümlerde kullanılan elektrotların tayin limiti grafiği	53
Şekil 6.3 Elektrotun farklı iyonlara karşı sergilediği potansiyometrik davranış	54
Şekil 6.4 Ca^{2+} -Seçici PVC-Membran elektrotun cevap zamanı	55
Şekil 6.5 Ölçümlerde kullanılan elektrotların doğrusal çalışma aralığı	56
Şekil 6.6 Ca^{2+} -Seçici PVC-Membran elektrotun tekrarlanabilirliği	57
Şekil 6.7 Ca^{2+} -Seçici PVC-Membran elektrotun pH çalışma aralığı	57
Şekil 6.8 Soğuk şoku, 0,2-27. saatler arasında ölçülen potansiyel değerleri	59
Şekil 6.9 NaCl stresi, 0-27. saatler arasında ölçülen potansiyel değerleri	60
Şekil 6.10 150 mM NaCl, 0-50. saatler arasında ölçülen potansiyel değerleri	61
Şekil 6.11 Kontrol bitkisine ait kalsiyum elektrot potansiyel değerleri (0-50 saat)	62

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	Bitki hücrelerinde kalsiyum taşıyıcı yapılar..... 11
Çizelge 2.2	Bazı gelişim süreçlerinde hücre içi kalsiyum değerleri ve kaynakları 14
Çizelge 3.1	Bazı abiyotik stres koşullarında bitkilerin sergilediği davranışlar..... 21
Çizelge 3.2	Stres türüne göre değişen hücre içi kalsiyum değerleri 30
Çizelge 3.3	Sık kullanılan direkt teşhis yöntemlerinin bir karşılaştırması 36
Çizelge 6.1	Elektrotlar için hesaplanan seçicilik sabitleri 54

BİTKİ HASTALIKLARININ TESPİTİ İÇİN KALSİYUM SEÇİCİ SENSÖRLERİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa NİĞDE

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ünal ŞENEL

Bitkilerde olumsuz çevre koşulları ve çeşitli organizmalara bağlı olarak ortaya çıkan stres, her yıl büyük miktarda ürünün kaybedilmesine sebep olmaktadır. Bu durum, bitki hastalıklarının erken tespit edilerek gerekli tedbirlerin zamanında alınmasını zaruri hale getirmektedir. Bu çalışmada, bitkilerin stres faktörlerine verdiği yanıtlar ve bu yanıtların ardındaki olaylar birbirleriyle ilişkili olarak incelenmiştir.

DeneySEL çalışmalarda grafit, sertleştirici ve epoksi karışımı ile kaplanan ince bakır tellerin membran çözeltisine daldırılmasıyla kalsiyum seçici sensörler elde edilmiştir. Birer adet kalsiyum seçici elektrot ve referans elektrot, kaktüs gövdesinde ksilemle ilişkili olacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu sensörler, aynı koşullarda tutulmakta olan bitkilerde soğuk şoku veya yüksek konsantrasyonda NaCl çözeltisi kullanılarak ortaya çıkarılan stresin potansiyometrik yöntemle tespit edilmesinde kullanılmıştır. Bitkilerin ksilemlerindeki kalsiyum seviyeleri 27-50 saat boyunca sürekli olarak potansiyometre aracılığı ile takip edilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, kalsiyum seçici sensörler ksilemde strese bağlı olarak meydana geldiği değerlendirilen kalsiyum değişimlerini tespit etmiştir. Bununla birlikte, potansiyometrik yöntemin ve kalsiyum seçici sensörlerin bu amaçla en

uygun şekilde nasıl kullanılabileceğine dair yeni çalışmalar yapılması gerekliliği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: kalsiyum seçici sensörler, potansiyometri, biyotik stres, abiyotik stres

**INVESTIGATION OF THE USE OF CALCIUM SELECTIVE SENSORS TO DETECT
PLANT DISEASES**

Mustafa NİĞDE

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK

Co-Adviser: Yrd. Doç. Dr. Ünal ŞENEL

Stress emerges in relation to unfavorable environmental conditions or various organisms causes huge amounts of product loss every year. This situation makes obligatory to take necessary measures in time by detecting plant diseases early on. In this study, plant responses to stress factors and events leading to these responses are reviewed in tandem.

During experimental studies, thin copper wires coated by graphite, plasticizer, and epoxy mixture were dipped into the membrane solution to obtain calcium-selective sensors. Calcium and reference electrodes, one for each, were inserted into the body of a cactus to be associated with xylem. These sensors were used to detect stress caused by either cold shock or high concentration NaCl solution by utilizing potentiometric method. Calcium levels of plants' xylem were monitored for 27-50 hours continuously via a potentiometer.

According to the results obtained in the study, calcium-selective sensors detected the changes in calcium levels which are considered to occur due to stress. However, it is also revealed the necessity for new studies on how to make best use of potentiometric method and calcium-selective sensors.

Keywords: Calcium selective sensors, potentiometry, biotic stress, abiotic stress

1.1 Literatür Özeti

Bitkiler; böcekler, çeşitli patojenler ya da çevresel koşullar nedeniyle strese ve çeşitli hastalıklara maruz kalmakta ve bu nedenle her yıl tarım ve ormancılık endüstrilerinde büyük miktarlarda ekonomik kayıp yaşanmaktadır. Zararlılara ve uygun olmayan çevre koşullarına karşı mücadele etmek için dünya genelinde büyük meblağlar harcanarak çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmekte ve ürün kayıplarının minimumda tutulmasına çalışılmaktadır. Söz konusu çevresel etkenler ve biyolojik zararlıların sebebiyet verdikleri kayıplara karşı mücadelenin ekonomik ve ekolojik açıdan en uygun yöntemlerle verilmesi, gerek sürdürülebilirliğin sağlanması, gerek zararın başlangıç aşamasından itibaren engellenmesi ve sınırlandırılabilmesi için gereklidir [1].

Günümüzde bitki hastalıklarının tespitine yönelik olarak laboratuvar analizleri ve makroskopik incelemeler yoluyla bilgi edinilmektedir. Ancak makroskopik düzeyde belirti gösteren bir bitkinin zaten stres etmeninden önemli oranda etkilenmiş olduğu ve laboratuvar çalışmalarının da zaman alıcılığı göz önünde bulundurulmalıdır. Bu amaçla, teknolojinin gelişimine paralel olarak daha etkin ve daha karmaşık bitki koruma ve takip yöntemlerinin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Enfekte bitki materyalleri veya süs bitkileri gibi araçlar üzerinde taşınan patojenler de geniş alanları etkileyebilmektedir. Bu tür bitkilerin çoğu durumda enfeksiyon farkedilmeden kitlesel dağıtımlarının gerçekleşmesi patojenleri daha farklı ortamlara da yayarak büyük zararlara neden olabilmektedir. Bu patojenlere verilen yanıt bitkide biyotik stres belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur

ve başlangıç aşaması itibariyle abiyotik stres ile hemen hemen aynı yollarla sinyal iletimi sağlanır.

Kalsiyum iyonu (Ca^{2+}), bitki gelişimi için önemli bir mineraldir. Bitki hücre duvarı ve membranlarında yapısal eleman olarak bulunur, hücre içi organik ya da inorganik anyonların karşı katyonu olarak görev alır ve bitkilerdeki en önemli sekonder mesajcıdır. Ca^{2+} kökler tarafından alındıktan sonra ksilem aracılığı ile sürgünlere doğru taşınır. Köklerden ksileme geçişi ise hücreler arası boşluklar (apoplast) veya plasmodesmata aracılığı ile bağlantılı hücrelerin sitoplazmaları (simplast) yoluyla gerçekleştirilir. Fazla katyon birikiminin önüne geçilmesi ve kökteki hücrelerin sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarını ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) kullanarak sinyal iletimi sağlayabilmesi için Ca^{2+} iyonunun ksileme aktarımının kontrollü olarak gerçekleştirilmesi gerekir. Kalsiyumun bitki hücrelerine girişi ise plazma membranlarındaki iyon kanalları aracılığı ile olmaktadır.

Ca^{2+} fazla miktarlarda bulunduğu hücre için toksik etki gösterebileceğinden, Ca^{2+} -ATPazlar ya da H^+/Ca^{2+} antiporterleri tarafından stimüle edilmemiş hücrelerdeki $[Ca^{2+}]_{cyt}$ miktarı mikromolar altı seviyelerinde tutulmaktadır. Söz konusu yollarla $[Ca^{2+}]_{cyt}$ iyonları apoplasta veya endoplazmik retikulum (ER) ve vakuoller gibi hücre içi organellere gönderilir. ER, tonoplast veya plazma membranındaki katyon kanallarından hücreye hızlı Ca^{2+} akışı, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ miktarında dalgalanmalara sebep olur. Bu konsantrasyon değişimi, biyotik ve abiyotik strese karşı yanıtları da içeren çok çeşitli hücresel yanıtları başlatır. $[Ca^{2+}]_{cyt}$ değişimleri, Ca^{2+} iyonlarına bağlanarak konformasyonu veya katalitik aktivitesi değişen kalmodulin (CaM), kalsinörin B benzeri proteinler (CBL) ve kalsiyuma bağımlı protein kinazlar (CDPK) gibi proteinler aracılığı ile algılanır ve sinyal iletimi sürdürülür. Bitkilerde kalsiyumun rolü ile alakalı çalışmaların hatırı sayılır bir kısmı, kalsiyum sinyal ve cevap ağlarının ve bu ağların spesifikliğinin anlaşılması için sürdürülmektedir.

Bitki stresinin ve patojenlerin sebebiyet verdiği hastalıkların tespiti için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Hastalık ve stresin tespiti genellikle belirtiler ortaya çıktıktan sonra veya hastalık belli bir aşamadayken yapılabilmektedir. Hastalığa neden olan faktörün tespit ve tanımlanması için PCR gibi yöntemler kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca gaz kromatografisi gibi çeşitli analitik yöntemler, ortaya çıkan uçucu maddelerin ve dolayısıyla bir hastalık durumunun tespitini hassas bir şekilde yapabilmektedir. Son

yıllarda giderek artan bir şekilde kullanıma sunulan biyosensörler aracılığı ile hızlı ve hassas hastalık tespiti ve patojen tanımlama sistemleri, sahip olduğu pek çok avantaj sayesinde gelecekte geleneksel sistemlerin yerini almaya aday görünmektedir. Potansiyometrik yöntem ile kullanılacak daha basit sensörler ise, patojen ya da stres tipi tanımlamadan, çok erken safhada bu faktörlerin bitkide hastalık veya stres meydana getirip getirmediğini tespit edebilir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, mikro boyutta bütünüyle katı hal kompozit kalsiyum seçici elektrotlar geliştirilecek ve bu elektrotlar abiyotik stres faktörlerine maruz bırakılan bitkilerin gövdelerine ksilem ile bağlantılı olacak şekilde yerleştirilerek, strese maruz kalmadan önce ve sonraki Ca^{2+} konsantrasyonundaki değişimler potansiyometrik yöntemle gerçek zamanlı olarak takip edilecektir. Çalışmanın amacı, bu yöntemle bitkilerde hastalık ve stres durumlarının erkenden tespit edilebilirliğini görmektir. Başarılı olunması halinde, mevcut yöntemlere ek ve alternatif olarak yeni bir genel tarama yöntemi önerilmiş olacaktır.

1.3 Hipotez

Kalsiyum iyonu bitkinin savunma yanıtlarında aracılık eden çok önemli bir sekonder mesajcıdır. Aşırı sıcak veya soğuk, tuzluluk, kuraklık, yaralanma, patojen istilası gibi durumlarda çok kısa bir reaksiyon süresi içinde bitki hücrelerinin sitozolü içerisine görece büyük miktarlarda kalsiyum akışı olmaktadır. Kalsiyumun kökten alındıktan sonra bitki hücrelerine doğru taşınımına ksilem aracılık eder. Bu durumda, aynı koşullarda bulunan bitkilerde ksilemden hücrelerarası bölgeye ve oradan da hücre içine doğru gerçekleşen kalsiyum akışı, biyotik veya abiyotik stresin varlığında hızlanarak ksilemdeki kalsiyum konsantrasyonunun değişmesi şeklinde kendini gösterecektir. Ksilemle bağlantılı olacak şekilde bitki gövdesine yerleştirilecek bir kalsiyum seçici sensörle bu değişim tespit edilebilir.

BİTKİLER İÇİN KALSIYUMUN ÖNEMİ

Kalsiyum, bitkilerin büyüme ve gelişiminde, özellikle farklı koordinasyon bağları oluşturma ve böylelikle proteinler, organik asitler ve membranlarla kolaylıkla etkileşim sağlama yeteneğiyle önemli rol oynar. Hücre duvarı ve membranlarda kalsiyum pektat formunda yapısal olarak görev alır ve hücrelerin bir arada tutunmasını sağlar. Hücre içi mikrotübüllerin oluşumunda görev alır. Vakuoldeki organik ve inorganik anyonlar için bir karşı katyon olarak Ca^{2+} iyonu gereklidir. Kök ve sürgün uçlarının büyüme ve gelişmesinde önemlidir. Polen tüpü gelişimi ve uzaması için gereklidir. $[Ca^{2+}]_{cyt}$ hücre içi mesajcı olarak önemli fonksiyonlar icra eder ve besin alımı veya biyotik/abiyotik stres gibi hücre dışı ve/veya çevresel uyarılara karşı birçok hücresel cevabın koordinasyonunu sağlar. Arabidopsis bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, erken stres cevap genleri de dahil olmak üzere en az 230 genin Ca^{2+} ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [2]. Bu bölümde, kalsiyumun bitkiler için makro ve mikro boyuttaki önemi ve görevleri tartışılacaktır.

2.1 Bitki Gelişiminde Kalsiyumun Önemi

Kalsiyum, bitkilerin iyi bir şekilde gelişmesi ve yapısal olarak güçlü olması için gereklidir. Suda çözünen kalsiyum bileşikleri bitki tarafından daha iyi bir şekilde alınabilir ve bu durumda kalsiyum yetersizliği daha az görülür. Kalsiyum hücre duvarında pektin polisakkarit matriks ile çapraz bağlar oluşturarak yapının rijitliğini sağlar. Bitkinin hızlı büyüme döneminde, çiçek ve meyve gibi yapılara destek olan kısımların yapısal birlikteliği ve gücü, ayrıca meyvenin kalitesi bitkinin ulaşabildiği kalsiyum miktarıyla

doğrudan ilişkilidir. Kalsiyumun yeterli olmaması, hücre bütünlüğünün bozulmasına ve dolayısıyla hücre içi yapıların, nihayetinde hücre ve dokuların kaybına kadar varan problemlere yol açar [3].

Bitkilerde kalsiyum yetersizliği zayıf kök gelişimi, çiçek burnu çürüklüğü, yaprak nekrozu ve kıvrılması, yetersiz meyve gelişimi gibi bir dizi probleme sebebiyet verir. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda bitkiye Ca^{2+} iyonunun düzenli olarak uygulanmasının stres ve hastalıklara karşı direnci artırdığı görülmüştür. Dolayısıyla, yetersiz Ca^{2+} miktarının da, bitkinin stres ve hastalık durumlarıyla başa çıkmasını zorlaştırdığı söylenebilir. Ayrıca, görece kısa süreli Ca^{2+} yoksunluğu, apikal meristem hücrelerinin ölümüne ve bitki büyümesinin tamamen durmasına neden olabilir. Bitkide büyük miktarlarda Ca^{2+} bulunması da zararlıdır. Fazla Ca^{2+} bitki hücreleri için toksik etki gösterir. Ayrıca tohumlarda çimlenme ve gelişimi olumsuz etkiler.

Bitkilerde, apoplasttaki Ca^{2+} konsantrasyonu mM düzeyinde iken, sitozolde normal şartlarda mikromolar altı düzeydedir. Bu büyük farka rağmen kalsiyum düzeylerinin nasıl korunduğu, bitkiye alımından organellere taşınımına kadar kalsiyum homeostasisinin nasıl sağlandığı, ilerleyen bölümlerde açıklanacaktır [4].

2.2 Bitkilerde Kalsiyum Taşınımı

2.2.1 Hücre Dışı Kalsiyum Taşınımı

Bitkilerde, su ve inorganik maddeleri absorbe eden kökler ile güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştüren yapraklar birbirlerinden ayrılmıştır. Dolayısıyla, bitkilerin yaşaması için bu organlarda gerçekleşen fizyolojik olayların uyumlu bir şekilde gerçekleşmesi gereklidir. Topraktan su ve inorganik maddelerin absorpsiyonu ile yapraklarda gerçekleşen transpirasyon, karbondioksit absorpsiyonu ve fotosentez gibi faaliyetler birbirleriyle yakından ilişkili süreçlerdir. Bir genelleme yapılacak olursa, mineraller ve su bitkide yukarı doğru hareket ederken, fotosentez ürünleri de aşağı yönlü hareket eder.

Mineraller ve suyun yaprak ve sürgünlere doğru hareketi birkaç farklı doku boyunca devam eder. Köklerdeki emici tüylerde başlayan bu hareket, trakeidler ve daha sonra

vasküler sistemin taşıyıcı elemanları, ki tamamı ksilem olarak adlandırılır, tarafından su ve mineraller parankima dokusuna ve hücreler arası boşluklara iletilir.

Emici tüyler tarafından absorbe edilen su ve diğer moleküllerin trakeid ve dolayısıyla ksileme ulaşması için kökteki korteks ve endodermisi aşması gerekir. Korteksin aşılması üç farklı yolla gerçekleştirilebilir.

- Apoplast. Moleküller hiçbir membranı geçmez ve hiçbir hücreye girmez. Doğrudan hücreler arası boşluklarda hareket ederler.
- Transmembran yol. Moleküller hücre membranları boyunca hareket ederek hücreden hücreye geçer.
- Simplast. Moleküller hücreler arasındaki plasmodesmata adı verilen bağlantılar aracılığı ile taşınır.

Hangi yolla olursa olsun, moleküllerin korteksi aşmasının ardından endodermisi de aşmaları gerekir. Endodermis, Casparian bandı olarak da adlandırılan ve hücreler arası hareketi durduran bir yapıyı barındıran hücrelerden oluşur. Burada su hareketi durdurulur ve moleküller endodermis membranlarından geçmeye zorlanır. Endodermal hücrelere giren moleküller buradan trakeid ve dolayısıyla ksilemi oluşturan hücrelere serbestçe geçiş yapabilirler [5].

Trakeidler uzun, kalın ikincil hücre duvarlarına sahip ölü hücrelerdir. Hücre duvarlarının son kısımları konik şekilli ve gözeneksizdir ancak yan duvarları pek çok delik içerir. Fonksiyonel olduklarında bu delikler su ve minerallerin bir trakeidden diğerine geçişine olanak sağlayacak şekilde dizilirler. Trakeidler ayrıca büyük çekme dayanımına sahiptirler ve böylelikle mekanik olarak da bitkiye destek sağlarlar.

Ksilem, trakeide göre çapı biraz daha büyük olan taşıma hücreleridir. Anatomik olarak trakeidlere benzer olmakla birlikte, hücre duvarlarının son kısımları gözeneklidir ve yan duvarlardaki oyuklar da çok daha karmaşıktır. Bu sayede ksilemi oluşturan elemanlar uç uca eklenerek metrelerce uzunlukta damarsı yapılar oluşturabilirler. Ksilemdeki sıvı, 1-20 mg/ml kuru madde içerir. Ksilem pH değeri 5.2 ila 6.5 arasında değişen asidik bir karakterdedir. Ksilemde su ve mineraller dışında, köklerde sentezlenen azotlu bileşikler, şekerler, organik asitler ve bitki hormonları da bulunur. Genellikle, ksilemdeki

maddelerin taşınımı pasif ve enerji harcanmasını gerektirmeyen bir prosestir ve transpirasyonu itici güç olarak kullanır. Yani diğer bir ifadeyle, ksilem boyunca gerçekleşen taşınım transpirasyonla kontrol edilmektedir.

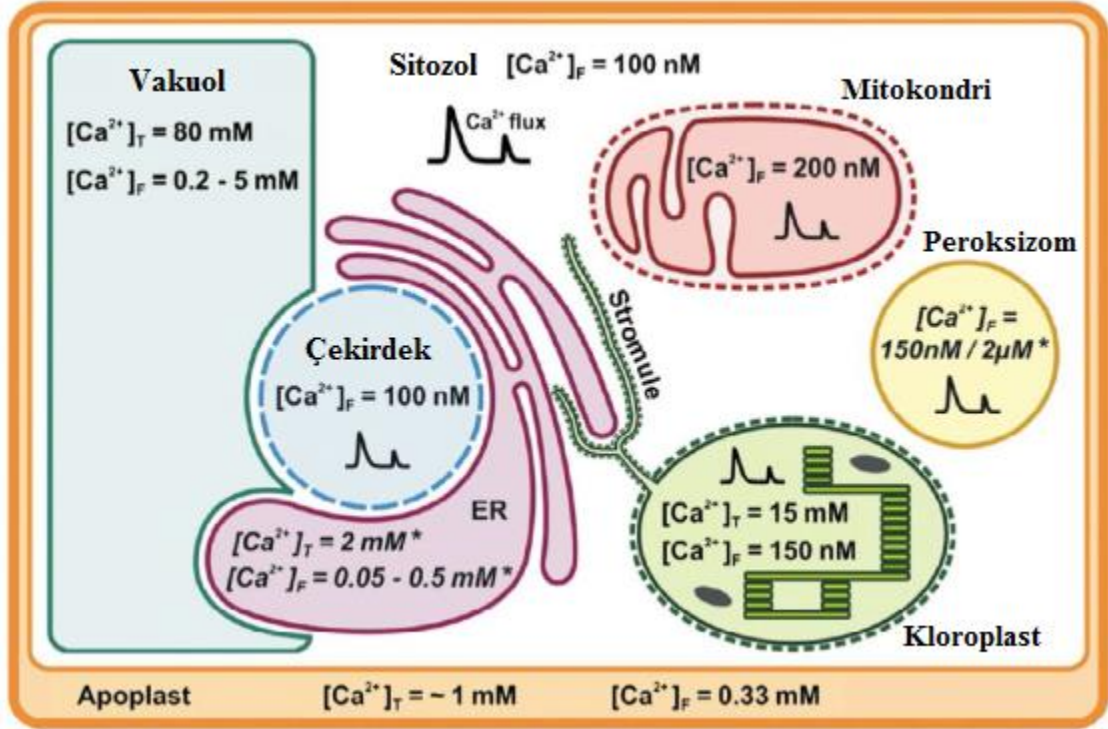
Yapraklarda ortaya çıkan fotosentez ürünlerinin aşağı yönlü taşınımı floem adı verilen karmaşık bir doku aracılığı ile gerçekleştirilir. Floem dört hücre tipinden müteşekkildir: Parankima hücreleri, fiberler, kalburlu boruları oluşturan hücreler ve bunlarla bağlantılı arkadaş hücreleri. Kalburlu borular trakeidlere benzer uzun ancak canlı hücrelerden oluşur ve floemdeki temel taşıyıcı hücrelerdir. Bu hücreler çekirdek veya vakuollere sahip değildir ve hücre duvarlarının uç ve sıklıkla da da yanal duvarlarında, kalbur bölgesi olarak adlandırılan gözenekli bölgeler bulunur. Kalburlu boruları oluşturan hücrelerin her biri en az bir arkadaş hücresi ile plasmodesmata adı verilen birçok hücresel bağlantı aracılığı ile temas halinde bulunur. Floemde bulunan sıvı 50-300 mg/ml kuru madde oranına sahiptir ve 8 ila 8.4 arasında değişen bazik karakterli bir pH değerindedir. Toplam kuru madde miktarının %80-90 kadarı şekerlerden oluşur. Azotlu bileşikler, aminoasitler, organik asitler, inorganik besin maddeleri ve bitki hormonları da floemde taşınan diğer maddelerdir. Floemdeki taşınım hızı ksileme göre 5 kat daha yavaştır [6].

Pek çok bitkide, dokular boyunca uzun mesafeli Ca^{2+} taşınımının büyük bölümünün apoplastik yollarla olduğu gösterilmiştir. Belirli koşullar altında, apoplastik yollar bitkilerdeki su taşınımının da büyük bir bölümünü sağlamaktadır. Su taşınımının transpirasyonla direkt olarak ilişkili olduğu göz önüne alınırsa, dokulara giden Ca^{2+} miktarının çoğunlukla transpirasyonla ilişkili olduğu söylenebilir. Vakuollere ulaşarak orada depolanan Ca^{2+} nadiren tekrar dolaşıma sokulur. Bu nedenle, yapraklar gibi transpirasyonun yoğun olduğu bitki organlarında büyük konsantrasyonlarda Ca^{2+} bulunur. Kökten sürgünlere doğru olan Ca^{2+} akışının, ileride bahsedilecek sinyal mekanizmalarıyla karışmaması için iyi bir şekilde düzenlenmesi gerekir. Bununla birlikte, pek çok diğer mekanizma gibi, bitki boyunca su taşınımı da Ca^{2+} iyonlarının da dahil olduğu bazı faktörler aracılığı ile düzenlenmektedir [7].

2.2.2 Hücre İçi Kalsiyum Taşınımı

Hücresel düzeyde, kalsiyum seviyeleri çok katı olarak tanımlanmış sınırlar içerisinde tutulur. Yukarıda da belirtildiği gibi, makro boyutta Ca^{2+} taşınımının önemli bir kısmı

apoplasttan ve dolayısıyla transpirasyonla ilişkili olarak yapıldığı düşünülürse, Ca^{2+} dengesinin korunması için çeşitli düzenleyici mekanizmalara ihtiyaç olduğu aşikardır. Normal şartlarda, bitki sürgünlerindeki Ca^{2+} miktarı, kuru ağırlığının %0.1 - %5'i arasındadır. Şekil x'te, tipik bir bitki hücresindeki kalsiyum derişimleri görülmektedir.

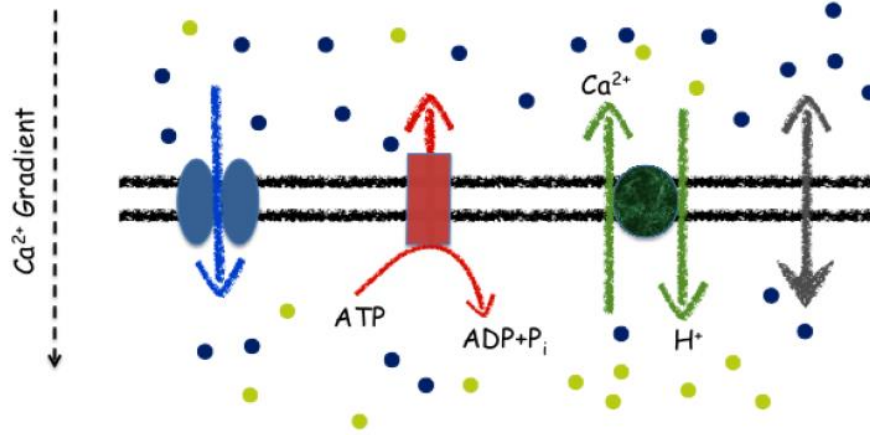


Şekil 2.1 Tipik bir bitki hücresi ve apoplast Ca^{2+} konsantrasyonları. Değerler yaklaşık olarak verilmiş olup, dokudan dokuya veya türden türe değişiklik gösterebilir.

Bitki hücresinde hücre duvarına ek olarak vakuol, endoplazmik retikulum, mitokondri ve kloroplast ana Ca^{2+} depolarıdır. Hem sitozol, hem de kendi içlerindeki kalsiyum dengesinin ve uyarılara spesifik yanıtların sağlanmasında bu organellerin rolü büyüktür. Herhangi bir stres sinyali algılanması durumunda sitozol Ca^{2+} düzeyi hızla yükselir ve bu yükseliş hem apoplast ve dolayısıyla ksilemden, hem de hücre içi depolardan gelen Ca^{2+} ile sağlanır.

Kalsiyum dengesinin sağlanması ve çeşitli uyarılara spesifik yanıtların verilebilmesi için, bitki hücrelerinde plazma membranı ve endomembranlarda bulunan çeşitli protein yapılarından müteşekkil bir Ca^{2+} taşıma sistemi bulunmaktadır. Bu sistem içerisinde çeşitli türlerde kanallar, iyon pompa ve değiştiricileri yer almaktadır. Proteinlerden oluşan ve çeşitli alt türleri olan bu yapılar bitki hücrelerinin hücre içi ve hücreler arası taşınım

faaliyetlerinin düzenlenmesinde etkin bir rol icra etmektedirler. İyon kanalları Ca^{2+} iyonlarının sitozole girişini sağlarken, iyon pompaları ve iyon değiştircileri hücre sitozolünden organellere veya hücreler arası boşluklara Ca^{2+} atılımını sağlamaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi, söz konusu ortamlar arasında $10^4 - 10^5$ kat $[\text{Ca}^{2+}]$ farkı bulunduğundan, sitozolden Ca^{2+} atılımı genellikle aktif taşıma, dolayısıyla enerji harcanmasını gerektiren bir süreçtir [8].



Şekil 2.2 Bitki hücresinde pasif ve aktif Ca^{2+} taşınımının şematik gösterimi [9]

Şekil 2.2'de mavi noktalar Ca^{2+} iyonlarını, yeşil noktalar ise H^+ iyonlarını temsil etmektedir. Mavi ve gri oklar, voltaj ve ligand kapılı iyon kanallarından geçişi, kırmızı ve yeşil oklar ise sırasıyla $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ azlar ve $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporterlerini göstermektedir. Kırmızı ile gösterilen iyon pompası ATP enerjisini kullanırken, yeşil ile gösterilen iyon değiştirici proton hareketinden doğan enerjiyi kullanır.

- Ca^{2+} kanalları temel olarak üç grupta incelenebilir: voltaj-bağımlı kanallar, ligand kapılı kanallar ve gerilme ile aktive olan kanallar.

Voltaj-bağımlı kanallar: Bitkilerde farklı membranlar üzerinde birkaç tip voltaj-bağımlı kanal bulunmaktadır. Plazma membranı üzerinde olan kanallar DACC (depolarizasyonla aktive olan Ca^{2+} kanalı) ve HACC (hiperpolarizasyonla aktive olan Ca^{2+} kanalı) olmak üzere ikiye ayrılır. Bunları haricinde, vakuoler membran üzerinde de SV kanalı (yavaş aktive olan vakuoler Ca^{2+} kanalı) bulunmaktadır. DACC ve HACC kanalları farklı çevresel uyarılara cevap vermektedir. Örneğın; DACC kanallarının dondurulma ve bitki-patojen etkileşimlerinde aktive olduğu gözlemlenmiştir. Farklı türde DACC kanalları bulunmaktadır ve farklı özelliklerde olmalarına rağmen, bunların hepsi mono ve divalent

katyonlara geçirgendirler. HACC kanalları ise Ca^{2+} beslenmesi, ABA (absisik asit) ve mavi ışık varlığı durumlarında aktive olmakta ve hücre içine sürekli Ca^{2+} alımına katkıda bulunmaktadır. SV kanalı, sitozol ve vakuoldeki Ca^{2+} konsantrasyonlarına göre aktive olan bir kanaldır.

Ligand-kapılı kanallar: Bitkilerde glutamat reseptör-benzeri (GLR) ve siklik nükleotid kapılı (CNGC) kanallar plazma membranında bulunur ve her birinin 20'den fazla alt türü bulunmaktadır. Gerçekte bu kanallar seçici olmayan katyon kanalları (NSCC) kategorisinde olsa da, kalsiyuma olan geçirgenlikleri daha fazladır ve voltajdan bağımsız Ca^{2+} geçirgen kanallar olarak da bilinirler. CNGC kanalları, siklik nükleotidler tarafından aktive edilen plama kanallarıdır. Pek çok çalışma, patojenlere verilen yanıtta CNGC kanallarının aktive olduğunu göstermektedir. Ayrıca bazı CNGC türlerinin uca odaklı Ca^{2+} gradyenti oluşturarak polen tüp gelişiminde düzenleyici rol oynadığı görülmüştür. Bazı CNGC kanal türlerinin de tuz stresi sırasında sodyum-potasyum dengesinin korunmasında rol oynadıklarına dair bilgiler mevcuttur. GLR kanalları çeşitli kalsiyum sinyal yollarının yanı sıra dokunma, osmotik stres ve soğuk gibi abiyotik stres koşullarında aktive olmaktadır. Ayrıca biyotik stres koşullarında önemli savunma sinyal molekülleri de GLR kanalları aracılığı ile düzenlenmektedir. Endomembranlarda bulunan ligand kapılı kanallar özellikle vakuol ve ER'de bulunurlar. Diğer fonksiyonlarının yanı sıra, kalsiyum aracılıklı bitki stres cevaplarında aktive olduklarına dair güçlü emareler bulunmaktadır [4].

Gerilme ile aktive olan kanallar: Mekanik etkilere (dokunma gibi) duyarlı MCC kanallarının, bitkinin mekanik etkilere olan cevabında sitozol Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak rol oynadığı düşünülmektedir [10].

- Ca^{2+} pompaları ve iyon değiştiricileri, kalsiyum iyonlarının sitozolden aktif taşıma yoluyla atılımını sağlayan hücre yapılarıdır. Ca^{2+}/ATP azlar ve Ca^{2+}/H^{+} antiporterleri bu görevi yerine getiren en önemli proteinlerdir. Sitozolden Ca^{2+} atılımı ile birkaç önemli fayda sağlanır. Bunlardan ilki, serbest $[Ca^{2+}]_{cyt}$ konsantrasyonunun belirli bir seviyede tutulmasının sağlanmasıdır. İkincisi, sinyal veya başka sebeplerle meydana gelen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgalanmalarının düzeltilerek $[Ca^{2+}]_{cyt}$ seviyesinin eski haline getirilmesi ve böylece kalsiyum sinyallerinin büyüklük ve hücre içi konumlarının etkilenmesidir. Bir

diğer fayda olarak, bu proteinler kalsiyum kanalları ile birlikte çalışarak hücre içi ve hücre dışı kalsiyum depolarının sonraki sinyaller için yenilenmesini ve lokalize kalsiyum dalgalanmaları oluşumunu sağlar. Ayrıca ER fonksiyonları için gerekli kalsiyum da bu proteinler aracılığıyla sağlanır. Kalsiyum haricinde, bu proteinler Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , ve Mn^{2+} gibi iyonların da atılımını sağlayarak hücreyi mineral toksisitesinden korur.

Ca²⁺/ATPazlar: Bu iyon pompaları tüm membran proteinlerinin %0,1'ini oluşturur ve plazma membranı ve endomembranlarda Ca²⁺/H⁺ antiporterlerine göre 30-100 kat daha az bulunurlar. Görevleri, hücre içine giren Ca²⁺ iyonlarını sürekli olarak ER içerisine veya hücre dışına atmaktır. Bu iyon pompalarının çok farklı alt çeşitlerinin bulunması, farklı hücresel süreçleri ilgilendiren spesifik Ca²⁺ sinyallerine özel cevaplar verilebilmesi için önemlidir. Pek çok Ca²⁺/ATPaz alt tipinin ekspresyonları yüksek tuzluluk veya yüksek [Ca²⁺]_{cyt} durumlarında artmakta, bazı alt tipler ise sadece stres koşullarında üretilmektedir.

Ca²⁺/H⁺ antiporterleri: Birçok alt tipi bulunan bu yapıların Ca²⁺/ATPazlardan farkı, iyon taşınımı sırasında ATP'ye ihtiyaç duymamalarıdır. Ayrıca Ca²⁺ iyonuna olan afiniteleri daha azdır ve Mg²⁺ ve ağır metal katyonlarının taşınımını da yapabilirler. Sitozoldeki iyon yükünü hücre dışına ve vakuollere itebilirler [8]. Çizelge 2.1, membranlar üzerinde bulunan çeşitli proteinler ve düzenleyicilerini genel olarak ortaya koymaktadır.

Çizelge 2.1 Bitki hücrelerinde kalsiyum taşıyıcı yapılar [11].

Membran	Ca ²⁺ Akısının Yönü	Taşıyıcı Türü	Ana Fizyolojik Düzenleyiciler
Plazma Membranı	Sitozol içerisine	CNGC	cAMP, cGMP, CaM
		DACC	Voltaj
		GLR	Aminoasitler
		HACC	Voltaj, ROS, [Ca ²⁺] _{cyt} , ABA
		MCC	Mekanik uyarıcı
	Hücre dışına	ACA	[Ca ²⁺] _{cyt} , CaM
		ECA	[Ca ²⁺] _{cyt} ?

Çizelge 2.1 Bitki hücrelerinde kalsiyum taşıyıcı yapılar [11].

<i>Tonoplast</i>	Sitozol içerisine	InsP ₃ R-benzeri	InsP ₃
		RyR-benzeri	cADPR
		SV kanalı (AtTPC1)	Voltaj, [Ca ²⁺]cyt, pH, CaM
		VVCa kanalı	Voltaj, [Ca ²⁺]cyt, Voltaj, [Ca ²⁺]vac
	Vakuol içerisine	ACA	CaM
		CAX	pH değişimi, [Ca ²⁺]cyt
<i>Endoplazmik Retikulum (ER)</i>	Sitozol içerisine	InsP ₃ R-benzeri	InsP ₃
		NAADPR-benzeri	NAADP
		NSCC	Voltaj
		RyR-benzeri	cADPR
	ER lümeni içerisine	ACA	[Ca ²⁺]cyt, CaM
		ECA	[Ca ²⁺]cyt ?
<i>Mitokondri (iç zar)</i>	Sitozol içerisine	Ca ²⁺ değiştirici ?	pH değişimi, Ca ²⁺ ?
	Matriks içerisine	Ca ²⁺ uniporter	Ca ²⁺ ?, voltaj ?
		Ca ²⁺ uniporter	Ca ²⁺ ?, voltaj ?
<i>Kloroplast (iç zar)</i>	Sitozol içerisine	ACA ?	[Ca ²⁺]cyt, CaM
	Stroma içerisine	Ca ²⁺ uniporter	Ca ²⁺ ?, voltaj ?
		Ca ²⁺ /H ⁺ değiştirici	[Ca ²⁺]cyt, CaM
<i>Golgi</i>	Sitozol içerisine	Bilinmiyor	Bilinmiyor
	Golgi içerisine	ECA	[Ca ²⁺]cyt ?
<i>Çekirdek zarı</i>	Sitozol içerisine	ECA ?	[Ca ²⁺]cyt ?
	Çekirdek içerisine	NSCC	Voltaj

2.3 Bitki Sinyal Yolaklarında Kalsiyum

Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, etkin bir Ca^{2+} taşıma sistemi, Ca^{2+} iyonunun bitkideki görevlerini en etkin şekilde yapmasına olanak sağlamaktadır. Bu görevler arasında kuşkusuz en önemlilerinden biri, kalsiyumun sekonder mesajcı olarak bitki sinyal yolaklarında oynadığı rollerdir. Tek sekonder mesajcı kalsiyum iyonları değildir ancak kalsiyum en önemlileri olarak görülmektedir. NO, reaktif oksijen türleri ya da siklik nükleotidler gibi çeşitli bileşikler de sekonder mesajcı olarak bitki hücrelerinde görev alırlar. Sekonder mesajcının sinyal iletim yolaklarındaki önemleri çok büyüktür. Çeşitli uyarıların hücre membranındaki özel reseptörlerce algılanmasının ardından, hücre içi sinyal iletimi sekonder mesajcılar aracılığı ile devam eder. Bazı sinyaller birden fazla sekonder mesajcının etkileşimleri ile iletilebilir. Sekonder mesajcının faaliyeti ile hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artar.

Bitkilerde Ca^{2+} aracılıklı sinyaller çeşitli lokal ve sistemik fonksiyonlar için büyük öneme sahiptir. Kök gelişimi, stomataların açılıp kapanması, biyolojik ritim, abiyotik stres cevapları, bitki-patojen etkileşimleri, simbiyoz ve üreme mekanizmaları gibi çeşitli olaylarda, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ değerlerinde geçici ve hızlı artışlar gözlenmektedir. Sitozolde düşük şiddette veya geçici olarak gerçekleşen bu $[Ca^{2+}]$ dalgalanmaları genellikle pek çok gelişimsel ve yaşamsal olay ile çevresel etkilere karşı cevap oluşturmak için yeterli olur. Bu artışlar, sinyalin şekli, şiddeti, frekansı ve süresi stimüle edici faktöre göre değişmekle birlikte, grafiğe geçirildiğinde genelde geçici büyük tek pik, iki pik (bifazik) ya da tekrarlanan dalgalanmalar şeklinde görülür. $[Ca^{2+}]_{cyt}$ değişimleri, bir önceki kısımda bahsedilen taşıyıcı yapılarca düzenlenir ve böylece her bir uyarana özgü parametrelerde $[Ca^{2+}]_{cyt}$ profilleri meydana gelir.

Daha sonraki aşamada, uyarılara spesifik olan ve bu nedenle Ca^{2+} imzaları olarak da adlandırılan bu konsantrasyon değişimleri, proteinler aracılığı ile uygun cevapları düzenleyen hücresel bilgi haline dönüşür. Ca^{2+} imzalarının algılanması ve hücresel bilgiye dönüştürülmesinde görev alan ve Ca^{2+} sensör proteinleri olarak da adlandırılan Ca^{2+} bağlayan proteinlerin (CBP) ortak özelliği, spesifik $[Ca^{2+}]_{cyt}$ profiline uygun şekilde tersinir olarak Ca^{2+} bağlayan yapısal bölgeleri içermeleridir. Ca^{2+} ile bağlanma gerçekleşikten sonra bu proteinlerin konformasyonları ve katalitik aktiviteleri değişir. Bu duruma ek

olarak, sensör proteinlerin çeşitliliği de spesifik, güvenilir ve esnek sinyal iletimi ve işlenmesi için büyük önem arz eder. Bu proteinlere örnek olarak kalmodulin (CaM) ve CaM benzeri proteinler, kalsiyuma bağımlı protein kinazlar (CPDK), kalsinörin-B benzeri proteinler (CBL), protein fosfatazlar (PP) ve fosfolipazlar (PL) verilebilir. Bu proteinlerin bazıları gerekli cevabın gösterilebilmesi için farklı bir proteinle etkileşime girerken, CDPK gibi proteinler direkt olarak hedef bölgeye ulaşır ve hücre sel cevabı uyandır.

Çizelge 2.2 Bazı gelişim süreçlerinde hücre içi kalsiyum değerleri ve kaynakları [12].

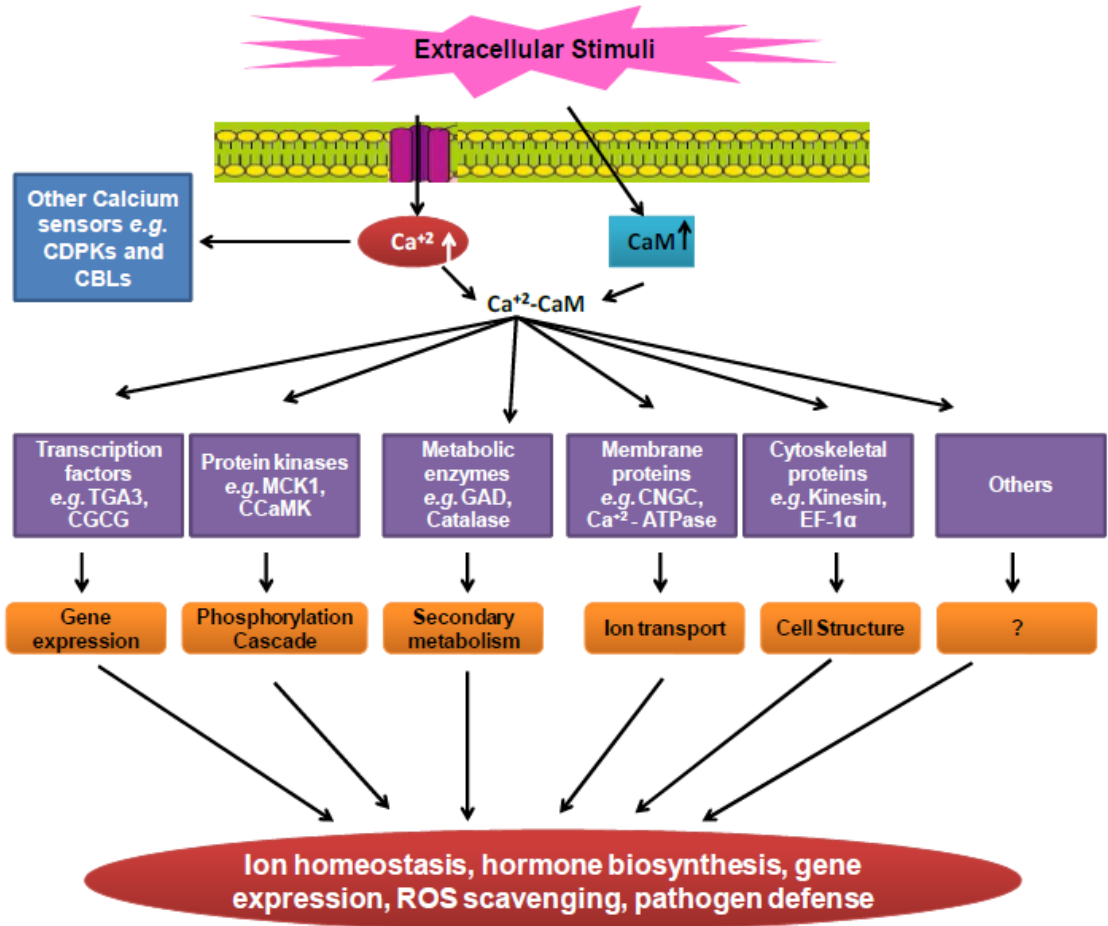
Gelişim süreci veya çevresel etki türü	Karakteristik $[Ca^{2+}]_{cyt}$ değişimi	Sitozole Ca^{2+} sağlayan kaynak(lar)
<i>Polen tüpü uzaması</i>	Apikal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	Apoplast ve hücre içi depolar
<i>Polen tüpü iç uyumsuzluk cevabı</i>	Çiçek sapında hücre içi $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgası	Apoplast ve hücre içi depolar (IP_3 -bağımlı)
<i>Döllenmeden sonraki hücre polaritesi</i>	Sperm birleşme bölgesinden başlayan hücre içi $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgasının neden olduğu $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	Apoplast
<i>Hücre bölünmesi</i>	$[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	
<i>Tohum çimlenmesi (giberellinler)</i>	Hafif $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	
<i>Apoptozis</i>	Yavaş ve sürekli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	
<i>Kırmızı ışık</i>	$[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	Apoplast
<i>Mavi ışık</i>	Kısa süreli (saniyeler mertebesinde) $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki	Apoplast
<i>Circadian ritimleri</i>	Circadian $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgalanmaları	

Çizelge 2.2 Bazı gelişim süreçlerinde hücre içi kalsiyum değerleri ve kaynakları [12].

<i>Stomaların kapanması (ABA, sfingosin-1-fosfat)</i>	(1) Hücre çevresinde $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (2) Vakuol çevresinde $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (3) $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgalanmaları	(1) Apoplast (2) Vakuol (3) Apoplast ve hücre içi depolar
<i>CO₂</i>	Koruyucu hücrelerde $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	Apoplast
<i>Apoplast Ca²⁺ seviyesi artışı</i>	Koruyucu hücrelerde $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgalanmaları	Apoplast
<i>Oksin cevapları</i>	Yavaş, uzun süreli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ değerinde dalgalanmalar	
<i>Ksilem K⁺ yüklemesi</i>	$[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	
<i>Ekzositoz</i>	$[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	
<i>Kökteki hücrelerin uzaması</i>	Uzun süreli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	Apoplast
<i>Kökteki emici tüylerin uzaması</i>	Apikalde uzun süreli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	Apoplast
<i>Sikloz inhibisyonu</i>	$[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	
<i>Nodülasyon</i>	Başlangıçta $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı, sonra $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgalanmaları	Apoplast
<i>Yaprak dökümü</i>	Uzun süreli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	
<i>UV-B</i>	Yavaş $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı, birkaç dakika boyunca süren yüksek $[Ca^{2+}]_{cyt}$ değerleri	Apoplast

Sinyal iletiminin sonunda, Ca^{2+} ile kompleks yapan sensör proteinleri, bir kısım hücresel taşıyıcı proteinlerin yanı sıra transkripsiyon faktörleri ve protein kinazlar gibi farklı enzimleri ve sinyal proteinlerini hedefleyerek sinyal iletiminin nihai amacına ulaşmasına aracılık etmektedirler. Bu tür proteinlerin bazılarını kodlayan genlerin ekspresyonları da bu yolla uyarılabilir. Sonuç olarak hücreler ve dolayısıyla bitki, nihai cevaba yönelik süreci tamamlayarak apoptozis, tolerans, belirli genlerin ekspresyonu gibi gerekli cevap ya da cevapları vermiş olur.

Şekil 2.3'te, hücre içi sinyal iletimi ve neden olabileceği cevapları gösteren örnek bir süreç CaM üzerinden verilmiştir.



Şekil 2.3 Bitkilerde Ca^{2+}/CaM aracılıklı sinyal ağı.

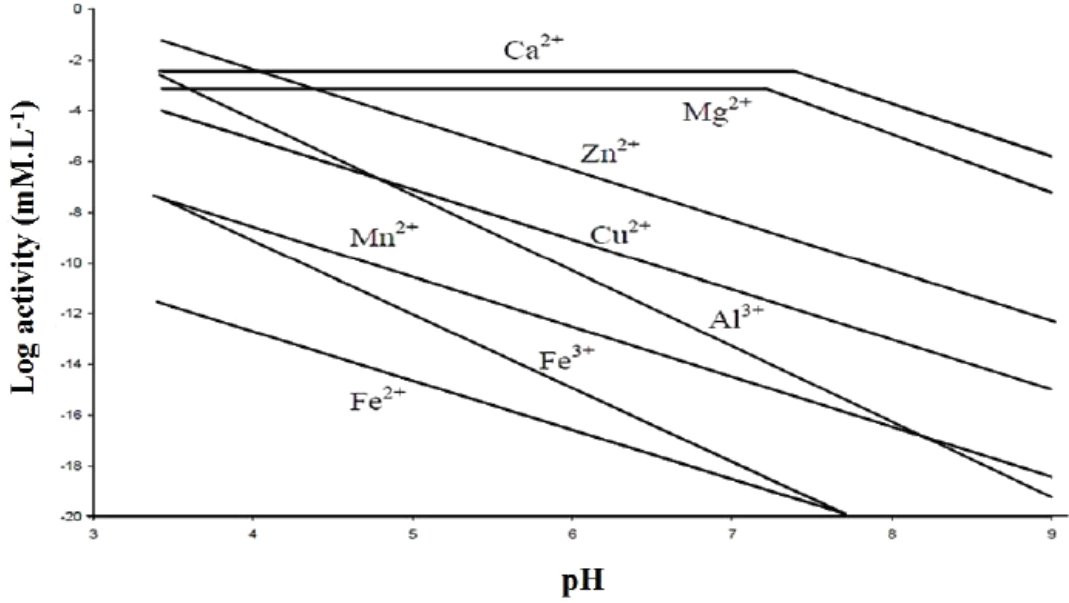
Görüldüğü gibi, bu kompleks çeşitli proteinlere bağlanarak aktivitelerini değiştirebilir ve çeşitli fizyolojik cevapları uyarabilir [4]. Ca^{2+} iyonlarının bitkilerin farklı stres koşullarında

sergiledikleri cevaplar ve patojenlere karşı immüniteleri ile ilgili görevleri, bir sonraki bölümde açıklanacaktır.

BİTKİLERDE STRES VE BİTKİ HASTALIKLARINI TESPİT YÖNTEMLERİ

Bitkiler yaşamlarını sürdürdükleri alanlarda, gelişimlerini kısıtlayıcı çeşitli olumsuz koşullara maruz kalmaktadırlar. Bitkilerde büyüme, gelişme ve metabolizmayı etkileyen ya da engelleyen durumlara stres adı verilmektedir. Başka bir ifadeyle, büyüme, gelişme ve üretim için genetik potansiyelin ifadesini olumsuz şekilde etkileyen herhangi bir çevresel faktörü veya bunların etkileşimlerini içermektedir. Stres, bitkilerde biyotik ya da abiyotik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda belli değişimleri meydana getirmesi ve organizmada hasar oluşturma kapasitesi olarak da tanımlanabilir.

Abiyotik stres faktörleri soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, mekanik etkiler, rüzgar, bitkiye uyumsuz pH değeri ve besin yetersizliği gibi çevresel faktörlerdir. Biyotik stres faktörleri ise virüs, bakteri ve fungusları da içeren çeşitli patojenler, böcekler ve herbivorlardır. Bir koşulun bir bitki türü için stres oluşturması, diğer bir bitki türü için de stres oluşturacağı anlamına gelmez. Örneğin, sırasıyla 20°C ve 30°C'de optimum büyüme gösteren bezelye ve soya fasulyesi bitkilerinden, bezelye bitkisi sıcaklığın artması ile birlikte daha önce zarar görmeye başlar. Yani, soya fasulyesi daha fazla sıcaklık toleransına sahiptir. Bazı stres koşulları bitkilerin başka stres faktörlerine açık hale gelmesine zemin hazırlar. Örneğin; topraktaki pH değişikliği besin maddelerinin alımını kısıtlayarak besin yetersizliğine neden olabilir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 pH değişiminin bitki besin alımına etkisi [13].

Bitkiler strese birkaç yolla cevap verir:

- Kaçış, sadece koşulların uygun olduğu dönemlerde büyümedir. Örneğin, kuraklıktan önceki yağışlı mevsimde büyüme, gelişme ve üremelerini tamamlayan bitkilerin gösterdiği davranıştır.
- Sakınma, bitkilerin stres faktörünün olumsuz etkilerini azaltması veya engellemesidir. Dış çevrede stres oluşturabilecek koşullar bulursa da, bitki iç ortamında hücreler stresten uzak tutulurlar.
- Tolerans, karmaşık bir fizyolojik olaydır. Bitkiye ilk olarak öldürücü olmamak şartıyla yüksek şiddette stres uygulanır ve bunu takiben öldürücü strese maruz bırakılır. Bitkinin bu öldürücü strese dayanma, etkisini azaltma, onarma ve engelleme yeteneği tolerans olarak adlandırılır.
- Uyum ve adaptasyon, sırasıyla bir sonraki nesle geçirilemeyen ve geçirilebilen stres cevaplarını ifade eden terimlerdir. Öncül bir strese maruz kalan ve buna bağlı olarak toleransı artan bir bitki, uyumlanmış kabul edilir. Strese adaptasyon ve uyum, anatomik ve morfolojik seviyeden hücresel, biyokimyasal ve moleküler seviyeye kadar meydana gelen birbirleriyle ilişkili olaylarla sağlanmaktadır.

Hücrelerin stres toleransının artmasına neden olan hücresel cevaplar; hücre döngüsü, hücre bölünmesi, hücrelerin endomembran ve vakuol sistemleri ile hücre duvarı yapısındaki değişiklikleri kapsamaktadır. Biyokimyasal seviyede, bitkiler prolin ve glisin betain gibi ozmodüzenleyici bileşiklerin üretimini de içeren metabolizmadaki değişikliklerle strese karşı koymaktadır. Stres sinyalinin algılanması ile ilgili moleküler olaylar ise, strese karşı genetik düzeyde verilen cevabın sonuçlarıdır [14].

Bitkilerin biyotik veya abiyotik strese maruz kalmaları, bitki metabolizmasında değişikliklere ve dolayısıyla bazı fizyolojik bedeller ödenmesine sebebiyet vermektedir. Bu durum bitkileri sağlıklı büyüme ve gelişmeden uzaklaştırarak, nihai aşamada verimi olumsuz yönde etkiler. Söz konusu kayıplar çoğu bitki türünde %50'yi aşan oranlara varmaktadır.

Bitkilerin stres ve hastalıklara ve dolayısıyla bu tür durumlardan kaynaklanan olumsuz etkilere karşı savunmasındaki en önemli adımlardan biri, etkin ve hızlı cevap için stresin zamanında algılanabilmesidir. Stres algılandıktan sonra, bitkilerin temel savunma mekanizmaları stres faktörüne göre değişen karmaşık sinyal yollarını aktive eder. Spesifik iyon kanalları ve kinaz kaskadları aktive edilir, reaktif oksijen türlerinin (ROS) yanı sıra absisik asit, salisilik asit, jasmonik asit ve etilen gibi bitki hormonlarının birikimi görülür ve bütün bunlarla birlikte gen ekspresyonlarının yeniden düzenlenmesi, bitkinin yeterli savunma cevabını göstermesine ve biyolojik hasarın en aza indirilmesi için toleransın artmasına aracılık eder [15].

Stres konusunda önemli bir diğer husus, bitkilerin genelde aynı anda birden fazla stres faktörüyle başa çıkabilmesidir. Örneğin; yüksek sıcaklık stresi genelde kuraklık stresi ile birlikte yaşanır. Bitki aynı anda hem biyotik, hem abiyotik strese maruz kalabilir. Bu gibi durumlarda bazen bitkinin bir stres faktörüne verdiği cevap, diğerine verdiği cevabı güçlendirebilir.

3.1 Bazı Önemli Abiyotik Stres Faktörleri

Abiyotik stres koşullarında, stres türüne göre bitkiler farklı davranışlar sergilerler (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Bazı abiyotik stres koşullarında bitkilerin sergilediği davranışlar [16].

Stres Türü	Sonuçları	Bitki Yanıtları
<i>Yüksek sıcaklık stresi</i>	Yüksek sıcaklık yoğun buharlaşmaya ve su yetersizliğine sebep olur. Sonuç, giderek artan enzim eksikliğine bağlı bitki ölümüdür.	Etkin protein tamir sistemleri ve genel protein stabilitesi hayatta kalmak için önemlidir. Sıcaklık, bitkinin ortama uyum sağlamasına sebep olabilir.
<i>Donma ve soğuk stresi</i>	Biyokimyasal reaksiyonlar yavaşlar, fotosentez devam etse de karbondioksit fiksasyonu zorlaşır ve oksijenli radikallerin zarar vermesine yol açar. Donma, hücre membranlarını bozan buz kristalleri oluşumuna neden olur.	Soğuğa adapte olabilen bitkilerde büyümenin durdurulması metabolizmadaki değişikliklerle engellenebilir. Buz kristallerinin oluşumu osmolit birikimi ve hidrofilik proteinlerin senteziyle engellenebilir.
<i>Kuraklık</i>	Suyun yapraklara taşınamaması fotosentezi azaltır.	Yapraklarda kıvrılma ve diğer morfolojik değişiklikler görülür. Stomaların kapatılması, ABA tarafından uyarılan transpirasyonu azaltır. Bitki içi su su potansiyelini azaltarak daha fazla su emilmesine olanak sağlayan metabolitlerin birikimi görülür.

Çizelge 3.1 Bazı abiyotik stres koşullarında bitkilerin sergilediği davranışlar [16].

<i>Su altında kalma</i>	Mitokondri faaliyetlerini zorlaştıran anoksik veya mikroaerobik koşullar oluşur.	Genellikle köklerde görülen kaviteletin oluşumu söz konusudur. Bunlar kök ve sürgünler arasında oksijen ve etilen değişimi yapılmasına olanak sağlar.
<i>Ağır metal birikimi ve metal stresi</i>	Belli bir düzeyi geçtiğinde, detoksifikasyon reaksiyonları ve depolama kapasitesi yetersiz kalabilir.	Fazla metal iyonları dışarı atılabilir veya vakuolde depolanabilir. Oksijen radikalleri oluşumuna da sebebiyet verebilirler.
<i>Yoğun ışık stresi</i>	Fazla ışık, foto-oksidatif hasara ve fotosentez inhibisyonuna neden olan reaktif ara ve yan ürünlerin üretimini artırır.	ROS üretimi artar ve hücrenin ve kloroplastın düzgün çalışmasını sağlayan protein, lipid ve enzimlerin oksidasyonu sağlanır.

Bazı önemli abiyotik stres koşulları ve bitkilerde neden oldukları savunma davranışları aşağıda verilmiştir.

3.1.1 Tuzluluk

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan tuzluluk, tarım arazilerini olumsuz etkilemekte ve bu topraklarda yetişen bitkilerde önemli verim kayıpları ve büyüme-gelişme yetersizliklerine neden olmaktadır. Ülkemiz topraklarının yaklaşık 1.5 milyon hektarı (%30'dan fazlası sulanabilir alan olmak üzere) tuzluluk sorunuyla karşı karşıyadır. Dünya genelinde bakıldığında ise, toplam büyüklüğü 800 milyon hektardan fazla olan geniş karasal alanlar tuzluluktan etkilenmektedir ki, bu dünyanın tüm karasal alanlarının %6'sından fazladır. Dünyada kuru tarım yapılan 150 milyon hektarlık arazinin yaklaşık %20'si çeşitli oranlarda ikincil tuzluluk tehdidi altındadır. Sulama yapılan toplam 230

milyon hektar arazinin ise yaklaşık 45 milyon hektarlık bir kısmı tuzdan etkilenmektedir. Tuzdan etkilenen bu toprakların büyük kısmı, Na_2SO_4 ve NaCl tuzluluğu göstermektedir. tskt2. Ekilebilir topraklardaki bu yoğun tuz birikiminin, ilerleyen zamanlarda daha da harap edici boyutlara ulaşacağı tahmin edilmektedir [17].

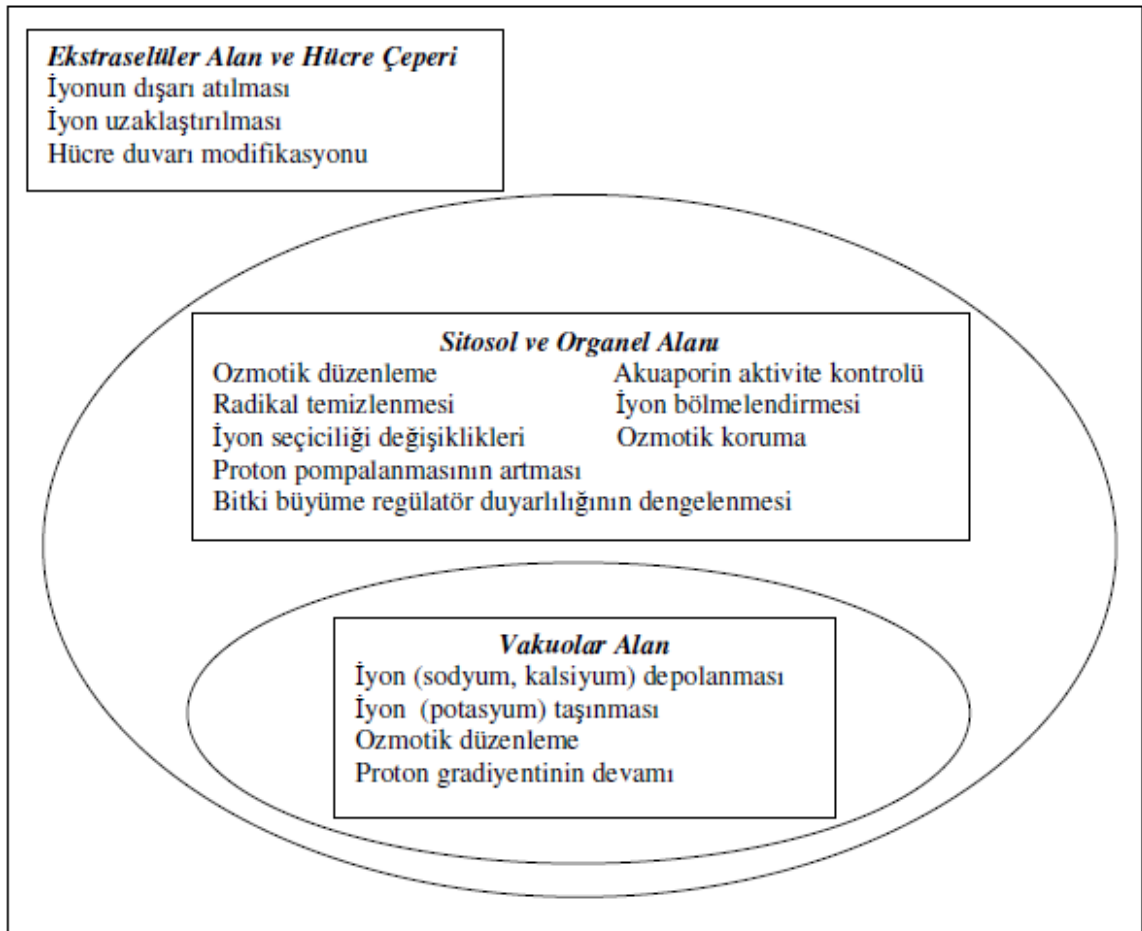
Verimli toprakları tehdit eden tuzluluk ve tuz stresi, bitkiler üzerindeki etkisini yapısal, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarda değişikliklere neden olarak göstermektedir. Bu olumsuz etkiler tuzun çeşidine, stresin düzeyine ve süresine, strese maruz kalan bitkinin genotipine ve gelişim evresine bağlı olarak değişir. Tuz stresi, bitkileri temelde osmotik ve iyonik strese neden olarak etkiler. Köklerde NaCl konsantrasyonunun artmasıyla birlikte ilk olarak osmotik stres oluşmaktadır. Bu durum kullanılabilir su miktarının azalmasına sebep olur. Bu olay “fizyolojik kuraklık” olarak da adlandırılmaktadır. Kullanılabilir su miktarının azalmasının bir sonucu olarak, hücre genişlemesi azalır ve sürgün gelişiminde yavaşlama görülür. Osmotik stresin devamında iyon stresi meydana gelir. İyon stresinin ortaya çıkması halinde, ortamda artan Na^+ ve Cl^- iyonlarının K^+ , Ca^{2+} ve NO_3^- gibi iyonlarla rekabete girmesiyle bitkilerde iyon dengesinde bozulma ve besin eksikliği meydana gelir.

Tuzluluğun bitkiler üzerindeki ikincil etkisi, bitkide meydana gelen yapısal bozulmalar ve toksik bileşiklerin sentezlenmesidir. NaCl 'nin başlıca ikincil etkileri; reaktif oksijen türlerinin (ROS) sentezi ve bunun sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres koşullarında klorofil gibi hücre yapıları ve fonksiyonlarına hasar verilmesi, fotosentezin inhibisyonu, metabolik toksisite, bazı iyonların alımının azalması veya engellenmesi (özellikle K^+ ve Ca^{2+}) ve hücre ölümü olarak sayılabilir. Her bitki türü, genetik yapısına bağlı olarak tuzluluğa karşı farklı cevaplar verir. Tuzluluğa verilen farklı cevaplar sadece iki farklı bitki türü için değil, aynı türün alt tipleri için de geçerlidir.

Tuz stresi, Ca^{2+} alımını olumsuz yönde etkiler. Na^+ , hücre zarındaki Ca^{2+} ile yer değiştirerek membranın apoplast kısmında dengeli halde tutulan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ iyon oranının artmasını sağlar. Bu durum membranın fizyolojik ve fonksiyonel yapısının bozulmasına ve hücrenin Ca^{2+} dengesinde olumsuzluklara neden olur. Yüksek Na^+ konsantrasyonu; hücrenin iç membran yapılarında bağlı halde bulunan Ca^{2+} iyonlarının serbest hale

geçmesine, hücrenin Ca^{2+} depolarının boşalmasına ve sitozolde serbest Ca^{2+} konsantrasyonunun artmasına neden olur [18].

Çeşitli tuzların yüksek konsantrasyonlarını içeren ortamlarda bitkilerin büyüme ve hayat döngülerini tamamlayabilme yeteneklerine tuz toleransı denir. Tuz toleransının boyutu temelde bitki türüne bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Tolerans davranışı gösteren bitkiler, Şekil 3.2’de görüldüğü gibi, ilgili biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları devreye sokmaktadırlar.



Şekil 3.2 Bitki tuz stresi ile ilgili olan biyokimyasal fonksiyonlar [19].

3.1.2 Yüksek Sıcaklık

Yüksek sıcaklık stresi, özellikle optimum büyüme sıcaklığındaki 1.5-6°C’lik artış ile fotosentezin inhibisyonuna, hücre membranlarının zarar görmesine ve hücre ölümüne neden olan bir abiyotik stres faktörüdür. Yüksek sıcaklık birçok önemli tarımsal bitkinin verimliliğini sınırlamaktadır. Toprak yüzey sıcaklıklarının 50°C’yi aştığı kurak ve yarı kurak

bölgelerde, yüksek toprak sıcaklığı bitki populasyonlarının önemli oranda azalmasına neden olmaktadır. Artan sıcaklık bitki gelişiminin farklı evrelerini inhibe etmektedir. Bir genotipin yüksek sıcaklıkta hayatta kalma yeteneği bitkinin çeşidine, bitki gelişim evresine, hücre tiplerinin hassasiyetine, yüksek sıcaklığın derecesi ve süresine bağlıdır.

Birçok tarımsal bitki, belli dönemlerde yüksek sıcaklık stresine maruz kalmaktadır. Yüksek sıcaklık stresi, bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal işlevlere zarar vererek büyüme, ürün ve kalitede azalmaya neden olmaktadır. Her bitki türünün optimum fonksiyon gösterdiği bir sıcaklık aralığı vardır. Türe özgü olan bu sıcaklık aralığı termal kinetik pencere olarak tanımlanmaktadır. Optimum sıcaklık aralığının dışındaki sıcaklıklar fotosentez, membran bütünlüğü ve enzim kararlılığını içeren birçok fizyolojik işlevde değişikliklere neden olmaktadır.

Termal tolerans (termotolerans) karmaşık bir fizyolojik olaydır. Tanım olarak, ilk olarak öldürücü olmayan yüksek bir sıcaklık uygulanmasının ardından öldürücü sıcaklığa maruz bırakılan bitkinin dayanma yeteneği olarak ifade edilebilir. Birçok bitkinin yüksek sıcaklık koşullarında hayatta kalma ve iyileşme gücü kalıtsal ve kazanılan termal tolerans yetenekleri aracılığı ile belirlenmektedir.

Yüksek sıcaklık stresine karşı koyma faaliyetleri, sıcaklık sinyallerinin iletimi ve bu sinyallerin yüksek sıcaklık toleransının gelişimini sağlayan biyokimyasal fonksiyonlara dönüştürülerek hücresel düzeyde cevap verilmesiyle başlamaktadır. Yüksek sıcaklık toleransı tek bir termotolerant genle kontrol edilmemektedir. Yüksek sıcaklığa cevap olarak uyarılan gen ekspresyonlarındaki değişimler yüksek sıcaklık toleransı ile ilişkilidir. Tipik olarak, birçok genin ekspresyonu sıcaklık artışı ve buna bağlı stres durumunda azalırken, yüksek sıcaklık şoku genleri olarak adlandırılan genlerin spesifik bir grubu hızlı bir şekilde teşvik edilmektedir [14], [16].

3.1.3 Kuraklık

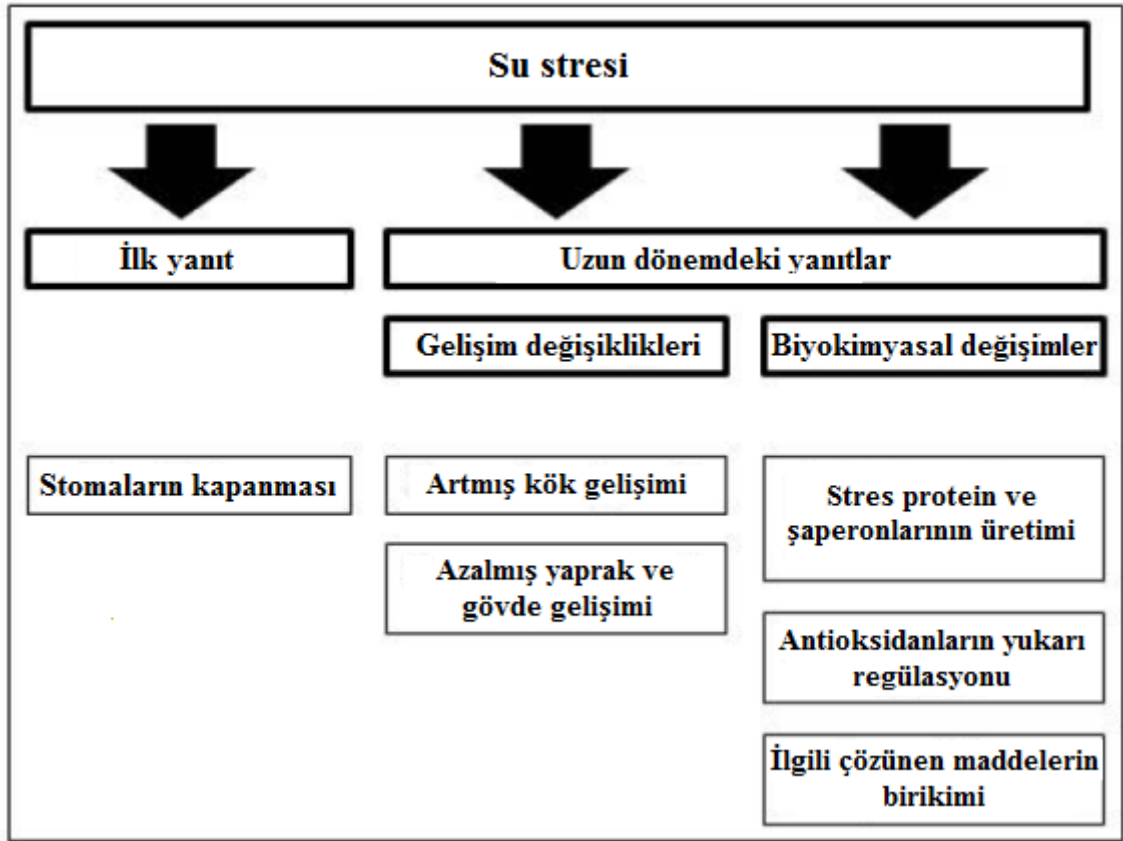
Kuraklık, dünya çapında tarımsal üretimi önemli derecede olumsuz etkilemektedir. Dünyada ekilebilir alanların % 20'sinde sulu tarım yapılırken, üretimin üçte biri sulanan topraklardan elde edilmektedir. Su kaynaklarının büyük bölümünün tuzluluk gibi nedenlerle yeterli kalitede olmaması tarım alanlarında kullanılmasını sınırlandırmakta,

elverişsiz olan bu suların tarım alanlarında kullanılması ise tuzluluk sorununu ortaya çıkarmaktadır. Bu durum sulu ve susuz tarım yapılan topraklardaki tuzluluk oranlarının kıyaslanmasıyla görülebilir. Susuz tarım uygulaması yapılan yaklaşık 1,5 milyar hektar alanın 32 milyon (%2) hektarında, çeşitli derecelerde toprak tuzluluğu ile karşılaşmaktadır. Sulu tarım uygulaması yapılan 230 milyon hektar alan içerisinde ise, tuzlu toprak oranı 45 milyon hektara (% 20) ulaşmaktadır.

Bitkilerin kuraklık koşullarına verdiği ilk cevap, stomaların kapatılarak transpirasyon yoluyla su kaybının azaltılmasıdır. Stomaların kapatılmasında bitki hormonu ABA ile hücre kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler rol oynamaktadır. Stomaların kapanmasına bağlı olarak da CO₂ alınımları azalır ve dolayısıyla fotosentez hızı düşer. Hücre içi CO₂ seviyesindeki azalma süperoksit ve hidrojen peroksit gibi ROS bileşiklerinin oluşmasına neden olur. Hücre membranları ve özellikle kloroplast membranları, ROS bileşiklerinin sebebiyet verdiği oksidatif strese ve bu durumun neden olduğu hasara karşı hassas yapılardır. ROS bileşikleri ayrıca proteinlerin denatürasyonuna ve nükleik asitlerde mutasyona yol açabilir. Bitkilerde kuraklık stresinin bir diğer etkisi de büyümenin ve sürgün gelişiminin yavaşlamasıdır.

Bitkilerin kuraklık stresine toleransı, yaprak yüzeyinin küçülmesi ve transpirasyonun azalması sonucu artmaktadır. Birçok bitki türünde, yaşlanma süreci ve yaşlı yaprakların ayrılması kuraklık stresi ile hızlandırılır. Toprağın derinliklerindeki suya ve neme ulaşabilmek için ise köklerde gelişme görülür.

Kuraklık stresinin moleküler ve biyokimyasal olarak neden olduğu temel değişiklikler arasında; fosfolipitlerin hidrolizi, denatüre proteinleri uzaklaştıran protein ve enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon düzeylerinin değişimi, ROS bileşiklerinin üretilmesinde ve uzaklaştırılmasında rol oynayan çeşitli enzimlerin aktivasyonları yer almaktadır. Ayrıca osmotik dengenin, membranların ve makromoleküllerin korunmasında çok önemli olan prolin, glutamat, glisin-betain, karnitin, mannitol, sorbitol, fruktan, polioll, trehaloz, sükroz, oligosakkaritler gibi bileşikler ve K⁺ gibi inorganik iyonlar sentezlenmektedir. Bu maddeler, kuraklık ve su kaybına karşı bitki hücrelerinin daha dirençli olmasını sağlamaktadır [20].



Şekil 3.3 Kuraklık stresine karşı bitkinin gösterdiği davranışlar [21].

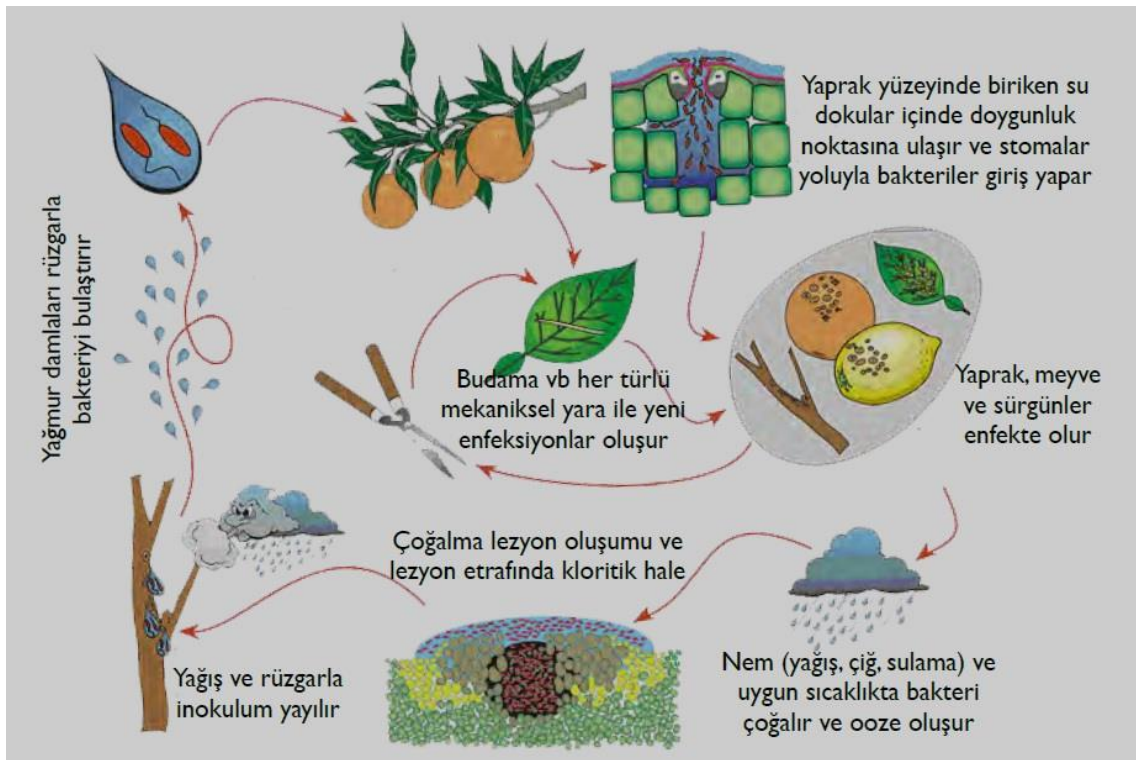
3.2 Biyotik Stres ve Bitki İmmün Sistemi

Biyotik stres, bitkilerde bakteri, fungus, virüs, nematod gibi mikroorganizmaların yanı sıra zararlı otlar ve böceklerin etkisiyle ortaya çıkan stres durumu olarak ifade edilebilir. Bu organizmaların bitkiye verdikleri hasarlar ve belirtiler birbirlerine ve abiyotik stres faktörlerinden kaynaklanana benzer olabilir. Bu durum tanıyı ve hızlı bir şekilde tedbir almayı zorlaştırmaktadır.

Biyotik stres faktörleri büyük zararlara sebep olur. Örneğin; bitkilerde hastalık yaptığı bilinen 1000'e yakın virüs türü vardır ve bunlar her yıl milyonlarca bitkinin ölümüne ve milyar dolar mertebelerinde ifade edilen rakamlarda ekonomik kayba yol açarlar.

Bitki immün sistemi, potansiyel patojenlere karşı çok katmanlı bir savunma yapısından oluşan karmaşık bir sistemdir. Patojenlere karşı ilk savunma hattı kütikula tabakası ve hücre duvarı gibi daha ziyade fiziksel işlevlere sahip yapılardır. İkinci bir savunma katmanı, bitkilerin ürettiği glukozit ve saponin gibi antimikrobiyal maddeler ve ikincil

metabolitlerdir. Bu kimyasallar, patojeni direkt olarak inaktive edebildikleri gibi, patojen tarafından üretilen enzimlerin inaktive edilmesi yoluyla da bitki savunmasına katkıda bulunabilirler. Bu iki savunma katmanı genellikle oldukça etkin olarak görev yapar ve çoğu patojen saldırısından bitkileri koruyabilir. Ancak stomata gibi doğal veya yaralanma ya da patojen enzim faaliyeti sonucu sonradan oluşan açıklıklardan giren patojenlere karşı belli koşullarda yetersiz kalabilirler. Patojenler bitkiye girdiğinde iki farklı durum görülebilir. Bitki patojeni hızla tanıyıp savunma sinyal kaskadlarının uyarılması aracılığıyla patojen gelişimini ve istilayı durdurabilir; ya da bunu başaramayıp hastalanabilir.



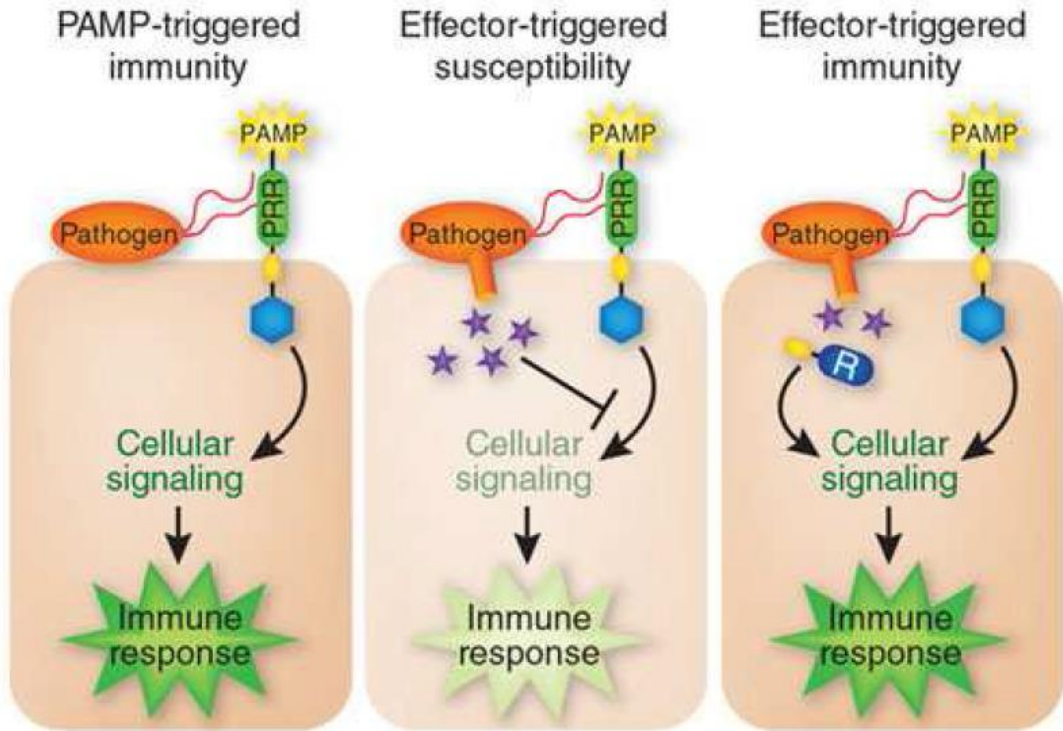
Şekil 3.4 Bitkilerde patojenlerin bulaşma yollarına bir örnek [22]

Bitkilerde bulaşıcı hastalıkların evreleri şu şekilde sınıflandırılabilir:

- İnokülasyon. Patojen mikroorganizmanın bitki ile teması, yani bulaşmasını ifade eder.
- Penetrasyon. Hastalık etmenin konukçu bitki dokusu içine girmesidir.
- Enfeksiyon. Hastalanmayı ifade eder.
- İnkübasyon. Enfeksiyondan ilk hastalık belirtilerinin görüldüğü zamana kadar geçen süreyi ifade eder.

- Sporulasyon. Patojenin hastalık belirtilerinin etrafında üreme organlarını (sporlar gibi) oluşturmaktadır [23].

Patojenin tanınması, patojen ilişkili moleküler yapılar (PAMP) olarak bilinen moleküllerin özel tanıyıcı reseptörler (PRR) aracılığı ile algılanması sonucunda, veya spesifik patojen gen ürünlerinin bitki R genleri ürünleri aracılığı ile tanınması sonucu gerçekleşir. PRR yoluyla gerçekleşen yanıtlar PAMP ile tetiklenen immünite (PTI) olarak adlandırılır. Bununla birlikte, bazı patojenler bu PTI yanıtlarında rol oynayan molekülleri bastırarak, efektör olarak adlandırılan proteinler üretebilir. Bu durum efektör ile tetiklenen baskılama (ETS) olarak adlandırılır. Böyle bir durumda, bitki R genleri tarafından kodlanan proteinler bu efektör proteinleri tanıyabilir ve böylece immün sistem harekete geçer [4].



Şekil 3.5 Bitki immün yanıtının farklı yolları [24]

Bitki immün yanıtlarında patojen tanınmasından sonraki adım, hücre içi sinyal iletiminin gerçekleşmesidir. Bu aşamada ilk gerçekleşen olaylar, sitozole Ca^{2+} iyonlarının girişi ve K^+ , NO_3^- ve Cl^- iyonları başta olmak üzere bazı iyonların dışarı atılmasıdır. Ca^{2+} iyonlarının sitozoldeki konsantrasyonunun artması çok sayıda sinyal yolağını aktive eder. Çeşitli protein kinazlar aktive olur ve nitrik oksit (NO) ve ROS türlerinin üretimi başlar. Daha

sonra farklı transkripsiyon faktörleri aktive olur ve bunlar aracılığı ile bazı gen ifadelerinde değişiklikler yapılarak nihai savunma yanıtları gösterilir. Bu yanıtlar; hücre duvarı modifikasyonu, antimikrobiyal bileşiklerin sentezi, programlanmış hücre ölümü, patojenez-ilişkili proteinlerin sentezi gibi faaliyetleri kapsar. Bu noktada dikkat çeken bir başka husus, bitkinin bir organında meydana gelen patojen saldırısı sonrasında, ilk saldırıyla ilişkisi olmayan diğer organlarda da patojene karşı artırılmış bir direnç görülmesidir.

Bitki hormonları da bitki savunma yanıtlarının ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Salisilik asit, jasmonik asit, etilen, absisik asit ve oksinler gibi hormonlar patojen ve böcek saldırılarına karşı bitkinin korunmasında etkindirler. Jasmonik asit ve etilenin savunma yanıtını güçlendirmede sinerjik bir rolleri olduğu gösterilmiştir [15], [25].

Çizelge 3.2’de, çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarında $[Ca^{2+}]_{cyt}$ değerlerinin değişimi görülmektedir. Ayrıca kalsiyum iyonlarının birincil olarak hangi kaynaktan sitozole geçiş yaptığı ve hücre içi ölçümlerin ne tür bir grafik gösterdiği de çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Stres türüne göre değişen hücre içi kalsiyum değerleri [12]

Stres Türü	Karakteristik $[Ca^{2+}]_{cyt}$ değişimi	Sitozole Ca^{2+} sağlayan kaynak(lar)
Yüksek sıcaklık şoku	15-30 dk süren $[Ca^{2+}]_{cyt}$ yükselmesi	Apoplast ve hücre içi kaynaklar (IP_3 -bağımlı)
Soğuk şoku	(1) Tek kısa $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki (saniyeler) (2) $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgalanmaları	(1) Apoplast
Yavaş soğutma	(1) Kısa bifazik $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki (saniyeler) (2) Yavaş $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (dakikalar)	(1) Apoplast (2) Apoplast ve hücre içi kaynaklar (IP_3 -bağımlı)

Çizelge 3.2 Stres türüne göre değişen hücre içi kalsiyum değerleri

Oksidatif stres (parakuat, süperoksit, hidrojen peroksit, ozon)	(1) Kısa $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki (2) Sürekli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (3) $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgalanmaları	(1) Apoplast (2) Apoplast ve hücre içi kaynaklar (IP ₃ -bağımlı)
Oksijen yetersizliği	(1) Bifazik yavaş $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki (dakikalar) (2) Sürekli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (saatler)	(1) Apoplast (2) Hücre içi kaynaklar, mitokondri dahil
Kuraklık/hiperosmotik stres (manitol)	(1) Bifazik yavaş $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki (dakikalar) (2) Sürekli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (saatler)	(1) Apoplast ve vakuol (IP ₃ -bağımlı)
Tuzluluk (NaCl)	(1) Dokuda dalga şeklinde yavaş bifazik $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki (dakikalar) (2) Sürekli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (saatler) (3) Azalmış $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (günler)	Apoplast ve vakuol
Hipo-osmotik stres	(1) Küçük bifazik $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (2) Büyük $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	(1) Apoplast (2) Apoplast ve hücre içi kaynaklar (IP ₃ -bağımlı)
Alüminyum	$[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı	

Çizelge 3.2 Stres türüne göre değişen hücre içi kalsiyum değerleri

Mekanik uyarılar (hareket, dokunma, rüzgar)	Tek kısa $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki, (saniyeler) $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgası	Hücre içi kaynaklar
Patojenler (elisitörler)	(1) Bifazik yavaş $[Ca^{2+}]_{cyt}$ piki (dakikalar) (2) Sürekli $[Ca^{2+}]_{cyt}$ artışı (saatler) (3) $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dalgalanmaları (elisitör türüne göre değişen büyüklüklerde)	(1) Apoplast (2) Apoplast ve hücre içi kaynaklar (IP ₃ -bağımlı)

3.3 Bitki Hastalıklarının Belirtileri ve Hastalık Teşhis Yöntemleri

Herhangi iki organizma arasında birinin diğerine zarar vermesi sonucunu doğuran ilişki biçimi antagonizm olarak tanımlanmaktadır. Antagonistik ilişkinin temelde dört yolu bulunmaktadır. Bunlar;

- Zararlı maddelerin sentezi. Bazı mikroorganizmalar diğerlerinin gelişmesine zarar verecek toprak toksinleri olarak bilinen özel maddeler oluştururlar. Çeşitli antibiyotikler, alkol ve kinon bu maddeler arasındadır.
- Besin rekabeti. Mikroorganizmalar ulaşabildikleri besin maddeleri için sürekli rekabet halindedir. Bu rekabet aynı tür iki canlı grup arasında görülebildiği gibi, farklı tür gruplar arasında da görülebilir.
- Ortam koşullarının değiştirilmesi. Mikroorganizmalar, gelişimleri sırasında buldukları ortamın ozmotik basıncını ve pH değerini değiştirebilir. Örneğin; pek çok mikroorganizma türü metabolizma yan ürünü ve atık olarak organik veya inorganik asitler açığa çıkarmaktadır. Dolayısıyla, bir süre sonra ortamın PH değeri bitkiler ve ortamdaki diğer organizmalar için olumsuz yönde değişebilir.

- Organizmalar arası parazitlik. Bitki koruma uygulama kitapçığındaki verilere göre, bazı organizmalar, beslenme ve üreme ihtiyaçlarını karşılamak için başka bir organizmanın üzerinde veya içinde parazit olarak yaşar. Bir diğer ifadeyle, parazitlik bir mikroorganizmanın yaşamak için bir başka organizmaya saldırıp, zarar vererek ondan yararlanmasıdır [26].

3.3.1 Bitkilerde Hastalanma ve Hastalık Belirtileri

Bitkilerde hastalanmada başlıca üç faktör vardır. Bunlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

- Hastalığı oluşturan biyotik veya abiyotik etkenler.
- Konukçu bitkinin fizyolojik yapısı.
- Çevre koşulları [27].

Parazitlik ilişkisi, bitki ve patojen dikkate alındığında çoğunlukla bitkinin zararına işler. Parazit ondan tek yanlı beslenir. Bazen bitki dokusu içine zararlı bileşikler de salgılar. Bitki bundan çeşitli biçimlerde zarar görür. Solunum faaliyetinin hızlanması, hücrede dağılma, çökme, turgor kaybı, klorofil dejenerasyonu, hücrelerde hipotrofi ve hipertrofi gibi olaylar görülür.

Biyotik ya da abiyotik nedenlerle hastalanmanın bir sonucu olarak önce hücre ve doku düzeyinde, daha sonra organ düzeyinde hastalık belirtileri ortaya çıkar. Bu belirtiler hücre düzeyindeyken makroskobik olarak fark edilememekle birlikte, doku ve organ düzeyindeki değişimler kolayca fark edilebilir. Hücre ve doku düzeyindeki değişimlerin yanında hastalıklı bitkide fizyolojik değişiklikler de görülmektedir [26].

Hastalıklı bitkilerde görülen semptomlar başlıca üç grupta incelenebilir.

Nekroz: Doku ve organlarda görülen ölümlerdir. Ölmüş dokuya nekrotik doku denir. Bitkide siyahlaşma veya kahverengileşme şeklinde görülür. En önemli nedeni, patojenin salgıladığı enzimler ve toksinlerin hücre yapısını bozmasıdır. Çimlenme-fide döneminde ve gelişme döneminde olmak üzere iki farklı şekilde görülür.

Çimlenme ve fide döneminde görülen nekrozda, çimlenmenin başlangıcında patojen faaliyeti sonucu fide toprak yüzeyine çıkamadan ölebilir. Bir diğer yol olarak, çıkış

sonrasında fidelerin kök boğazında incelme, lekeler, yan köklerde kahverengileşme şeklinde nekroz görülür.

Gelişme döneminde görülen nekrozda ise aşağıdaki belirtiler görülmektedir.

- Lokal lekeler: Toprak üstü organlarda yaprak, gövde, çiçek ve meyvelerde hemen hemen her hastalık için değişen şekil, irilik ve renkte oluşan lekelerdir. Paraziter etmenlerden funguslar çoğunlukla yuvarlak, bakteriler sulu ve yağlı şekilde köşeli veya yuvarlak, virusler ise mozaik ve halkalı lekelerden oluşurlar.
- Yanıklık: Özellikle yaprak, çiçek ve genç sürgünlerde sık rastlanan, kısa sürede hızla ilerleyip büyüyen ve lokal lekelerden farklı olarak sınırları belli olmayan nekroza yanıklık denir. Patojenlerin neden olduğu yanıklıklar genel olarak fungal veya bakteriyel kökenlidir.
- Yaralar: Abiyotik ve biyotik nedenlerden dolayı özellikle gövde, dal ve sürgünlerin kabuk tabakalarında ortaya çıkan çöküntü, ezilme, yarıma, parçalanma şeklinde meydana gelen ölü alanlardır.
- Çürüklükler: Taze sebze ve meyvelerde çoğu zaman olgunluğa yakın ya da olgunlaşma zamanında bahçede başlayıp depoda devam eden parankimatik doku bozulmalarıdır. Yumuşak ve sulu çürüklükler, kuru çürüklükler ve kök (odun) çürüklükleri olmak üzere üç farklı şekilde ortaya çıkar.
- Solgunluk: Bitkide turgor basıncının düşmesi veya herhangi bir nedenle hücre ve dokulara yeteri kadar suyun gidememesi sonucunda bitkinin solması ve pörsümesidir. İki şekilde ortaya çıkar:
 - ❖ Geçici solgunluk: Fizyolojik nedenlerden kaynaklanır. Koşullar normale döndüğünde bitki tekrar eski haline dönebilir.
 - ❖ Sürekli solgunluk: Patojenlerin istilası sonucu bitki su iletimindeki aksamalar sonucunda ortaya çıkar. Bu hastalıklara vasküler solgunluk hastalıkları denir. Bu şekilde meydana gelen solgunlukların geriye dönüşü yoktur.

Renk Değişiklikleri: Bitkilerde normal olarak yeşil olması gereken toprak üstü kısmının bazı abiyotik ve biyotik faktörlerin etkisiyle sararması, beyazlaşması veya kızarması şeklinde ortaya çıkan belirti tipidir. Bitkiye yeşil rengi veren klorofilin tamamen ortadan

kalkmasıyla beyazlaşma, klorofil oluşumunda ortaya çıkan gerileme veya klorofilin zarar görmesiyle sararma, dokuda antosiyan birikmesiyle kızarma şeklinde ortaya çıkar. En sık rastlanan renk değişikliği sararmadır (kloroz). Klorozun nedeni bitkinin topraktan yeteri kadar su ve mineral madde alamaması, demir noksanlığı, bacalardan çıkan kükürtdioksit (SO₂) gazı gibi abiyotik nedenler olabildiği gibi, bazı viral ve fungal etmenler de olabilir.

Şekil Bozuklukları (Deformasyonlar): Kültür bitkilerinin hücre, doku ve organlarında ortaya çıkan, normalin üzerinde veya altında gelişme şekil bozukluklarına neden olur. Nedenleri bakteri, fungus, virus gibi çeşitli patojenlerin yanı sıra nematodlar, böcekler ve hormon bileşikli herbisitler de olabilir. Tümör oluşumu ve biçimsiz oluşumlar olarak ikiye ayrılabilir:

- Tümör (ur) oluşumu: Bitkinin çeşitli kısımlarında oluşan tümör, gal veya ur oluşumu aşırı bölünmenin ürünleridir. Bu oluşumlar kök, gövde, dal, sürgün, tomurcuk, yaprak, çiçek, meyve gibi bitkinin hemen her yerinde oluşabilir. Uurlar genellikle bitkinin kök boğazında oluşur. Ur oluşumuna neden olan en yaygın rastlanan ve çok konukçulu patojen *Agrobacterium tumefaciens*'tir.
- Biçimsiz oluşumlar (deformasyon, çalılışma, azmalar): Canlı veya cansız etmenlerden kaynaklanabilir. Hormon karekterli herbisitler, toprakta zararlı kimyasalların bulunması, genetik bozukluklar, toprak ve çevre koşullarındaki ani değişiklikler abiyotik etkenler arasında sayılabilir. Biyotik etmenler olarak ise bakteriler, viruslar, viroidler, fitoplazmalar, spiroplazmalar, nematodlar, böcekler sayılabilir. Biyotik faktörlerden en fazla karşılaşılan viral etmenlerdir [22], [23], [26], [27].

3.3.2 Bitki Stres ve Hastalıklarının Tespit Yöntemleri

Bitkilerde stres/hastalık olduğu makroskopik belirtiler görülerek veya hastalık etkeni tanımlanarak anlaşılabilir. Hastalığın tam olarak ne olduğu sorusunun cevabını verebilmek için çeşitli yöntemlerden yararlanılmaktadır.

Hastalık tespiti ve tanımlanması doğrudan veya dolaylı yöntemlerle yapılabilir. Doğrudan yöntemlerde çeşitli moleküler ve serolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır ve genellikle büyük sayıda örneklerin analiz edilmesi gerektiğinde kullanılır. Hastalığa neden olan etken bu şekilde tanımlanmış olur. Dolaylı yöntemlerde ise morfolojik

değişiklikler, sıcaklık değişimi, solunum hızı değişikliği ve hasta bitkilerce ortama salınan uçucu organik maddelerin tespit ve analizi yapılarak hastalığın ne olduğu ortaya çıkarılmaktadır.

Doğrudan Yöntemler: Çizelge 3.3'te, günümüzde kullanılan bazı doğrudan teşhis yöntemleri çalışma limitleri, avantajları ve sınırlamaları açısından karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.3 Sık kullanılan direkt teşhis yöntemlerinin bir karşılaştırması (CFU: colony forming unit; koloni oluşturu birim) [28]

Yöntem Adı	Tayin Limiti (CFU/ml)	Avantajlar	Sınırlamalar
<i>PCR</i>	10^3 - 10^4	Olgunlaşmış ve yaygın teknoloji, taşınabilir, kolay kullanılabilir.	Etkinliği DNA ekstraksiyonuna bağlı, inhibitörler, polimeraz aktivitesi, PCR tamponu ve deoksi nükleosit trifosfat konsantrasyonu
<i>FISH</i>	10^3	Yüksek hassasiyet.	Otofloresans, foto-ışıldama bozulması
<i>ELISA</i>	10^5 - 10^6	Düşük maliyet, renk değişimi tespit amaçlı kullanılabilir	Bakteriler için düşük hassasiyet
<i>IF</i>	10^3	Yüksek hassasiyet, hedef dağılımı görüntülenebilir.	Foto-ışıldama bozulması
<i>FCM</i>	10^4	Çok sayıda parametrenin aynı anda ölçümü, hızlı tespit.	Yüksek maliyet, büyük miktarda gereksiz bilgi

- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), hastalık etkeninin DNA veya RNA'sının ekstrakte edilerek özel primerler ve enzimler vasıtasıyla amplifiye edilerek yüksek doğruluk ve hassasiyette tespitine dayanan bir yöntemdir.
- Floresans in-situ hibridizasyon (FISH), özellikle bakteriyel patojenlerin tespiti için mikroskopi ve bitki örneklerinden elde edilen patojene özgü RNA sekanslarının DNA problrarı ile hibridizasyonuna dayanan bir yöntemdir. Virüs ve fungus tespitinde de kullanılabilir [29].
- Enzim bağılı immünosorbent analizi (ELISA), hedef antijenlerin enzimle konjuge edilmiş antikora bağlanması ve ortamda görülen renk değişikliğine bağılı olarak tanı konulmasını sağlayan bir sistemdir.
- İmmünofloresans (IF), mikrobiyolojik örneklerin analizinde kullanılan floresans mikroskopisi temelli optik bir yöntemdir. Bitki dokularındaki patojen enfeksiyonları hakkında bilgi edinmek amacıyla da kullanılmaktadır.
- Akış sitometrisi (FCM), lazer tabanlı bir optik yöntem olup, hücre sayımı ve sınıflandırılmasının yanı sıra biyoışaretçi tespiti ve protein mühendisliği çalışmalarında da kullanılmaktadır. Analiz edilen hücrelerin bir sıvı içerisinde akarken tespit ve tanımlanmasına olanak sağlar [30], [31].

Dolaylı Yöntemler: Bu tür yöntemler, direkt olarak patojen tespit ve sınıflandırması yapmak yerine, çeşitli optik ve kimyasal yaklaşımlarla bitkide stres varlığı ve patojen kaynaklı hastalıkların tespitinde kullanılmaktadır.

- Termografi, bitki yüzey sıcaklıklarının ısıya duyarlı kameralarla takip edilmesi ve sıcaklık farklarının tespit edilmesiyle özellikle transpirasyonu etkileyen bitki hastalıklarının tespitinde kullanılan bir yöntemdir.
- Floresans görüntüleme, fotosentez ve ilişkili mekanizmalarda değişikliğe neden olan hastalıkların tespitinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde yapraklardaki klorofil floresansı ölçülerek sonuç elde edilmektedir.
- Hiperspektral teknik, elektromanyetik spektrumun nispeten geniş bir bölgesinin (350-2500 nm) kullanıldığı, üç boyutlu veri toplayabilen ve bu verilerin hızlı analizine imkan sağlayan bir tekniktir. Bitki hastalıklarının neden olduğu biyokimyasal ve

biyofiziksel özelliklerdeki farklılıkların değiştirdiği yansıma (reflektans) değerlerinin ölçümü ile hastalık tespiti yapılmasını sağlar.

- Gaz kromatografisi, patojenlerle enfekte olan bitkilerin ortama yaydığı uçucu organik bileşiklerin analizi aracılığı ile bitki hastalıklarını tespit etmeye yarayan bir yöntemdir. Üretilen bu bileşikler bitkinin maruz kaldığı stres türü konusunda oldukça spesifik olduğundan, gaz kromatografi yönteminin verdiği sonuçlar da stres türünün ve hastalığın altında yatan nedenin doğru belirlenmesinde önem arz etmektedir [32], [33].

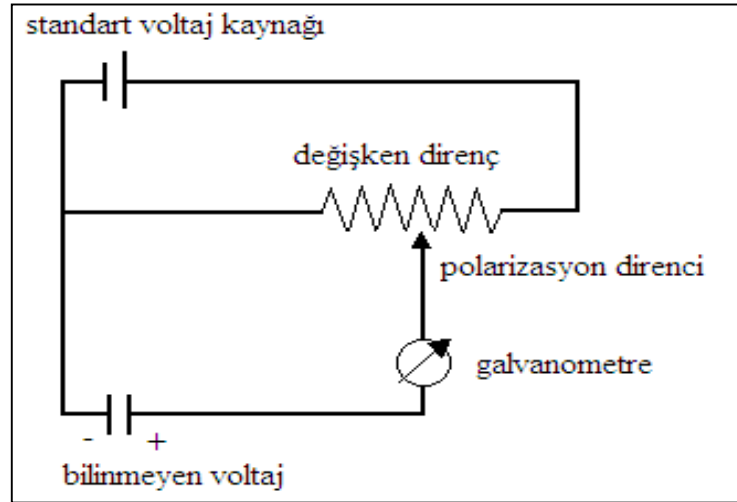
Hastalık Tespit ve Teşhisinde Sensörlerin Kullanımı: Çalışma türüne göre (elektrokimyasal, optik, elektriksel, manyetik, titreşim gibi) büyük çeşitlilik gösteren sensörler, bitki hastalıklarının tespit ve teşhisinde kullanılabilmektedir. Üreticilerin gerçek zamanlı veri analizi sağlayan, hızlı ve bitkiye önemli bir hasar vermeden çalışabilen sistemlere duyduğu ilginin bir sonucu olarak son zamanlarda giderek artan oranda kullanılmaktadır.

Sensörlerin tayin limitleri sensörün transduser kısmında nanomalzemelerin kullanımıyla artırılabilirdiği gibi, hastalık ve muhtemel patojenle ilgili daha spesifik tanımlamaların yapılabilmesi için de biyolojik tanıyıcı elemanların kullanımı söz konusu olabilir. Karbon, polimer, metal veya metal oksit tabanlı nanoparçacıklar gibi çeşitli nanomalzemelerin geniş yüzey alanı ve üstün optik ve elektriksel özellikleri kullanılan biyosensörün bazı özelliklerini güçlendirebilir. Öte yandan, antikor, enzim, DNA ve RNA gibi biyolojik maddelerin sensörlerdeki tanıyıcı bölgelerde kullanılmasıyla spesifik ve çok hassas ölçümler yapılmasına olanak sağlanmakta ve ayrıca bu maddelerin özel tanıma bölgeleri içermesi nedeniyle hatalı sonuçlar alma ihtimali düşürülmektedir.

Biyosensörlerin kullanımı her ne kadar avantajlı olsa da, özellikle kullanılan biyolojik maddelerin yapısı gereği pH ve sıcaklık gibi ortam şartlarına duyarlı oluşları ve depo ömürlerinin uzun olamaması kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu nedenle daha basit ve spesifik olmayan sensörlerin hastalık tespitinde kullanılması da olumlu karşılanabilir. Bununla birlikte, gerçekleştirilecek geliştirme çalışmaları doğrultusunda, yakın gelecekte bu tür sorunların en aza indirileceği ve sensörlerin bahsedilen avantajlarının daha pahalı ve karmaşık olan sistemlerin yerini almalarını sağlayabileceği değerlendirilmektedir [28], [34], [35].

POTANSİYOMETRİK YÖNTEM VE İYON SEÇİCİ SENSÖRLER

Potansiyel ölçümüne dayalı analitik yöntemler “potansiyometrik yöntemler” olarak adlandırılır. Potansiyometrik yöntem, akımın çok az geçtiği veya hiç geçmediği elektrokimyasal sistemlerde çalışma elektrotunun (indikatör elektrot) karşılaştırma elektrotuna (referans elektrot) karşı iyon konsantrasyonuna bağlı olarak sergilediği potansiyel değişiminin ölçüldüğü bir elektrokimyasal yöntemdir. Potansiyel ölçümüne dayalı olan tüm analitik yöntemler potansiyometrik yöntemler olarak adlandırılır.



Şekil 4.1 Bir potansiyometrenin çalışma prensibi [36]

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, devredeki değişken direncin ayarlanması sayesinde standart voltajın bilinen kısmı bilinmeyen voltaja karşı işaretlenir. Bu voltaj değerleri birbirine eşit olduğunda galvanometreden akım geçmez. Böylece bilinmeyen voltaj değeri, değişken direncin pozisyonundan okunabilir.

Potansiyometrik sistem, bir test hücresi (elektrolitik çözelti), buna bağlantılı olan indikatör elektrot (değişken potansiyel) ve referans elektrot (sabit potansiyel) ile kararlı bir potansiyometreden oluşur. Bunlara “potansiyometrik hücre elemanları” da denir. Analit çözeltisine daldırılan indikatör elektrotta (genellikle iyon seçici elektrot), mevcut iyon veya iyonların konsantrasyonuna bağlı olan bir potansiyel değişimi meydana gelir. Bu potansiyel değişimi ölçülerek iyonların derişimleri tayin edilebilir [37].

4.1 Potansiyometrik Tayin ve Nernst Eşitliği

Potansiyometrik tayin ilkesi; analizi yapılacak numune içerisinde iyon seçici elektrotların daldırılmasıyla, numune çözeltisinin derişimine bağlı olarak potansiyelde meydana gelen değişimin gözlenmesi temeline dayanır.

İyon seçici elektrotlarda, iyon seçici membran iç standart ve test çözeltisindeki iyonları birbirinden ayırır. Elektronlar, basit iyonlar veya test edilen iyonun yüklü ya da nötral kompleksleri, membranın iç kısımlarına doğru iç standart çözeltinin kompozisyonuyla orantılı olarak taşınırlar. Böylece oluşan elektrostatik motor kuvveti, standart referans elektrot yarı hücresiyle membran elektrot yarı hücresi birleştirilerek ölçülür.

Konsantrasyon ile elektrot potansiyeli arasındaki ilişki aşağıda gösterilmiştir.



Buradaki tersinir yarı reaksiyon ele alındığında, bir elektrotun potansiyel farkı (E), Nernst (Nernstian) Eşitliği ile (4.2) verilmiştir.

$$E = E^o \pm \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_C^c a_D^d \dots}{a_A^a a_B^b \dots} \quad (4.2)$$

E = İndikatör elektrot potansiyeli

E° = Standart elektrot potansiyeli

R = Gaz sabiti, 8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹

T = Sıcaklık, kelvin (0°C için 273,15 K)

F = Faraday sabiti = 96486 J.volt⁻¹

a_A^a, a_B^b, a_C^c ve a_D^d = Elektrotta hissedilen iyon aktiviteleri

a , b , c ve d = yarı reaksiyonda yer alan her bir türün mol sayısı

n = Alınan-verilen elektron sayısı

a_i iyon aktivitesi olmak üzere, eşitlik (4.2) tek bir iyon için yazılırsa, eşitlik (4.3)'teki halini alır.

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln a_i \quad (4.3)$$

(\pm) ; Anyonlar için (-), katyonlar için (+) olur.

Eğer iyon aktivitesi a_1 ' den a_2 'ye değişirse potansiyel değişimi eşitlik (4.4)'deki gibi olur.

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_2}{a_1} \quad (4.4)$$

Eşitlik (4.4)'e göre, çözeltilerde iyon aktivitesinin artması sonucu elektrodun cevabı logaritmik olarak gözlenir.

$$E = E^0 \pm \frac{2,303RT}{nF} \log \frac{a_2}{a_1} \quad (4.5)$$

Eğer ölçümler 25 °C'de alınırsa, sabit sayılar yerine yazıldığında (4.5) eşitliği (4.6) halini alır.

$$E = E^0 \pm \frac{0,0592}{n} \log \frac{a_2}{a_1} \quad (4.6)$$

Eşitlik (4.6) ya göre; 25 °C'de $E - \log_{(a)}$ ilişkisinin teorik değişimi n yüklü iyonlar için $59,2/n$ mV'tur. Bu değişim genel olarak katyonlar için pozitif anyonlar için negatiftir. Dolayısıyla tek yüklü, iki yüklü ve üç yüklü iyonlar için bu değer sırasıyla 59,2, 29,6 ve 19,8 mV'tur [36], [37], [38].

4.2 Referans Elektrotlar

Referans elektrotlar, bir hücrede kullanımı sırasında potansiyeli değişmeden kalabilen elektrotlardır. Bu elektrotlara "standart elektrotlar" da denir. Diğer bir deyişle elektrot potansiyeli tam olarak bilinen bir yarı hücredir. Analit çözeltisi ve bileşimi, referans elektrot potansiyelini etkilemez. Bununla birlikte, referans elektrot potansiyelinin

sıcaklıkla bir miktar değiştiği bilinmektedir. Referans elektrotların en önemli özellikleri, tekrarlanabilen sonuçlar vermeleri ve üzerlerinden küçük akımların geçmesi durumunda dahi potansiyellerinde bir değişim olmamasıdır. Potansiyel ölçümlerde yaygın olarak kalomel ve gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) referans elektrotları kullanılmaktadır.

Kalomel elektrot, 25 °C sıcaklıkta standart hidrojen elektroduna karşı 244 mV civarında potansiyel veren bir civa/civa klorür (Hg/HgCl) yarı hücresi olarak tanımlanabilir. Kalomel elektrotta gerçekleşen reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Nernst eşitliği uygulanırsa,

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{2} \log [\text{Cl}^-]^2 \quad (4.8)$$

şeklinde bir denklem elde edilir. Buna göre elektrot potansiyelinin sadece Cl^- iyonuna bağlı olduğu görülmektedir. Eşitlik 4.7'ye göre, eğer ortamdaki klor iyonu konsantrasyonunda bir azalma meydana gelirse, $\text{Hg}_2\text{Cl}_{2(k)}$ çözünerek ortama klor iyonu verir ve böylece konsantrasyonun sabit kalması sağlanır. Bunun sonucu olarak, elektrot potansiyelinin doğrudan klor iyonu konsantrasyonuna bağlı olduğu göz önüne alınırsa, elektrot potansiyeli sabit kalmaktadır. Ayrıca yine Nernst eşitliğinden çıkarılan bir diğer sonuç olarak, kalomel elektrot potansiyelinin sıcaklıkla değiştiği söylenebilir.

Gümüş/gümüş klorür elektrot, çok kullanılan bir başka referans elektrottur. Genellikle bir gümüş veya platin tel yüzeyine gümüş klorür kaplanmasıyla hazırlanır. Elektrot reaksiyonu aşağıda verilmiştir.



Nernst eşitliği uygulanırsa,

$$E = E^0 - 0,059 \log [\text{Cl}^-] \quad (4.10)$$

şeklinde bir denklem elde edilir. Görüldüğü gibi, elektrot potansiyeli burada da kalomel elektrotta olduğu gibi klor iyonu konsantrasyonuna bağlıdır. Elektrotta indirgenme veya yükseltgenme tepkimeleri sonucu oluşabilecek potansiyel değişimine karşı, ortama konulan potasyum klorür tampon görevi yapar. Gümüş/gümüş klorür elektrot, standart hidrojen elektroduna karşı 0,197 voltluk bir potansiyel değeri verir.

Kalomel elektrotlar 50 °C'den yüksek sıcaklıklarda tercih edilmez. Gümüş/gümüş klorür elektrotlar ise 275 °C'ye kadar kullanılabilir. Ayrıca kalomel elektrotta kullanılan civanın toksik olması da, bu elektrotların nispeten daha az tercih edilmesine neden olmaktadır [36], [38], [39], [40].

4.3 İyon Seçici Elektrotlar

Birçok iyonun yanında tek bir iyon seçici olarak cevap sergileyen elektrotlara iyon seçici elektrotlar adı verilmektedir. Bu elektrotlar serbest iyon aktivitesine duyarlıdır. İyonik şiddetin sabit tutulması halinde, konsantrasyon ve iyonik aktivite doğru orantılı olduğundan dolayı, iyon seçici bir elektrot kullanılarak bir çözeltide kullanılan elektrodun seçici olduğu iyon konsantrasyonu ölçülebilir.

İyon seçici bir membran, tüm iyon seçici elektrotlar için en önemli bileşendir. Sensörün analitteki tüm diğer iyonların yanında hangi iyon seçici olacağı membranla belirlenir. Eğer iki faz arasındaki sınır, yani buradaki durumda membran, iyonlar tarafından geçilirse, iki fazda da farklı potansiyellerin meydana geldiği bir elektrokimyasal denge durumu oluşur. Eğer sadece tek bir iyon bu sınırı aşarsa, iki faz arasındaki bu potansiyel farkı sadece bu iyonun iki fazdaki aktiviteleriyle belirlenir. Burada bir diğer husus, hiçbir elektrodun sadece bir iyon cevap vermediği ve bazı iyonların girişim yapabildiğidir. Bununla birlikte, bu elektrotlar sadece bir iyon karşı seçicilik gösterirler.

İyon-seçici elektrotların birçok alt sınıfı mevcuttur. Bunlar aşağıda verilmiştir.

1. Cam iyon-seçici elektrotlar
2. Metalik (katı-hal) iyon-seçici membran elektrotlar (I., II. ve III. Sınıf)
3. Kaplama tel elektrotlar
4. Sıvı-hal iyon-seçici elektrotlar
5. Gaz ve enzim elektrotlar
6. İyon-seçici alan etki transistörleri
7. Sıvı-membran iyon-seçici elektrotlar (polimer-membran elektrotlar)
8. Kompozit elektrotlar

Bu çalışmada bütünüyle katı hal kompozit elektrotlar üretilmiş ve kullanılmıştır.

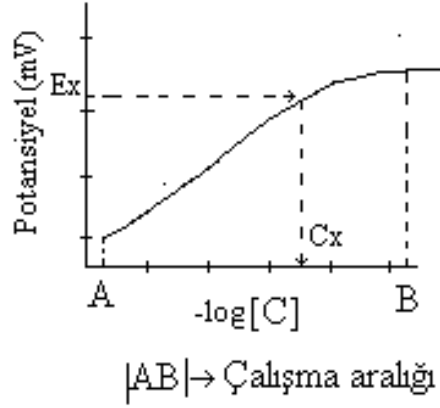
İyon-seçici elektrotlar genellikle aşağıda belirtilen dört farklı analitik uygulamada yaygın olarak kullanılır.

1. Doğrudan ölçümler,
2. Potansiyometrik titrasyonların dönüm noktalarının tayini,
3. Denge sabiti ve buna bağlı fiziksel sabitlerin hesaplanması,
4. Hareketli ortamlarda dedektör olarak kullanım.

Tez çalışmalarında iyon seçici elektrotlar doğrudan ölçümler için kullanılmıştır. Bir iyon veya molekülün doğrudan potansiyometrik ölçümle tayini hızlı ve basittir, sadece indikatör elektrodun deney çözeltisindeki potansiyeli ile analitin bir veya birden fazla standart çözeltisine daldırıldığında kazandığı potansiyellerin kıyaslanmasını gerektirir. Çoğu indikatör elektrot seçici olduğu için ön ayırma işlemlerine nadiren gerek duyulur. Ayrıca doğrudan potansiyometrik ölçümler zaman alıcı değildir ve iyon aktivitelerinin sürekli ve otomatik tayini için kolayca uygulanabilir.

İyon-seçici elektrotlar analit konsantrasyonlarını doğrudan ve seçimli olarak ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğrudan ölçüm yöntemlerinden en sık kullanılanı, ölçümü yapılan bir iyonun konsantrasyonuna karşı ölçülen potansiyelin grafiğe geçirilmesiyle alınan kalibrasyon eğrisini içerir. Kalibrasyon eğrisini; kullanılan ölçüm sistemi, test çözeltisinin iyonik şiddetindeki ve pH'daki değişimler veya yabancı kimyasal bileşiklerin konsantrasyonu, girişim yapan iyonlar ve sıcaklık değişimleri etkilemektedir.

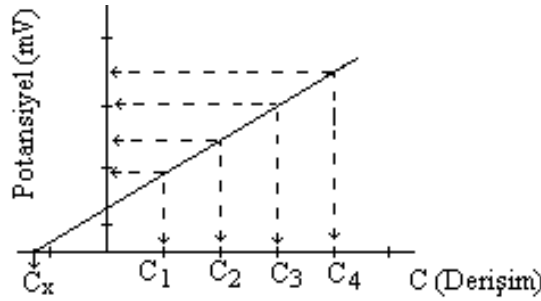
Kalibrasyon eğrisi yöntemi oldukça doğru sonuç verir. Fakat fazlaca ölçüm gerektirir. Eğer kalibrasyon almak için kullanılan standart çözeltilerin konsantrasyonları, ölçümü yapılan iyonun konsantrasyonuna yakınsa yöntemin doğruluğu daha da artabilir. Şekil 4.2'de basit bir kalibrasyon grafiği görülmektedir. Bu yöntemle analit potansiyeline (E_x) karşılık gelen bilinmeyen konsantrasyon (C_x) kalibrasyon grafiği ile tayin edilebilir [36], [38], [41], [42].



Şekil 4.2 Basit bir kalibrasyon grafiği [38]

Doğrudan ölçüm yöntemlerinden ikincisi standart ekleme yöntemidir. Bu yöntem, bilinen hacimdeki bir analit çözeltisine standart çözeltinin bilinen hacimde ilavesinden önce ve sonra elektrot sisteminin potansiyelinin ölçülmesine dayanır [42].

Standart ekleme yönteminin kalibrasyon yöntemine göre avantajı; matriks etkisinden kaynaklanabilecek girişimlerin en aza indirgemiş olmasıdır. Numune içeriği kalibrasyonda birbirinden farklı iken, standart eklemede aynı ortam şartları sağlanır. Şekil 4.3'te standart ekleme metodu ile iyon tayini grafiksel olarak görülmektedir.



Şekil 4.3 Standart ekleme metodu ile iyon tayini [38]

4.4 İyon Seçici Elektrotlarda Performansın Değerlendirilmesi

4.4.1 Seçicilik

Sadece tek bir iyon duyarlı bir elektrot yoktur. Bir iyonu ölçmek için kullanılan bir elektrot, başka bir iyon da duyarlılık gösterebilir. Girişim yapan diğer iyonların varlığı elektrot performansını büyük ölçüde düşürür. Bu iyonların girişimi, elektrot membranının yapısına bağlı olarak çeşitli şekillerde olabilir. Seçicilik bir iyon seçici elektrodun en

önemli özelliklerinden biridir. Analitin güvenilir şekilde ölçülüp ölçülemeyeceği elektrodun seçiciliğine göre anlaşılır.

Nernst eşitliğinin genişletilmiş bir hali olarak da değerlendirilebilen Nikolsky-Eisenman tarafından önerilen denklemde ilk kez seçicilik sabiti terimi kullanılmıştır. Pek çok ISE aşağıdaki eşitliğe uygun davranır.

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \log \left[a_x + \sum \left(k_{x,y}^{pot} a_y^{n_x/n_y} \right) \right] \quad (4.11)$$

Bu denklemde;

a_x = Ölçülecek iyonun aktivitesi,

a_y = Girişim yapan iyonun aktivitesi,

n_x, n_y = Her bir iyonun yükü,

$k_{x,y}^{pot}$ = Seçicilik katsayısıdır.

Yukarıdaki denklem, bir elektrodun ölçülecek iyon ve girişim yapan diğer iyon cevabını gösterir. Seçicilik katsayısı değeri büyüdükçe, elektrodun esas ölçülmek istenen iyon duyarlılığı azalır. Girişim yapan iyon olmaması durumunda elektrot Nernst değişimi gösterir [43].

4.4.2 Cevap Zamanı

İyon-seçici elektrotlarda cevap zamanı elektrodun fiziksel yapısıyla yakından ilgili olup, membranın duyarlı kısmıyla çözeltideki iyonun dengeye gelmesi için geçen zamandır. Uluslararası Kuramsal ve Uygulamalı Kimya Birliği'ne (IUPAC, 1994) göre dengeye gelme zamanının % 95'i olarak alınır ve t_{95} olarak gösterilir. Bu aynı zamanda denge potansiyelinin de %95'ine karşılık gelen değerdir [42].

Girişim yapan iyonlar, bir Nernst potansiyel farkı oluşması için taşınması gereken iyonların aktif elektrot yüzeyine ulaşmalarını geciktirir ve cevap zamanını etkiler.

4.4.3 Tayin Sınırı

İyon-seçici elektrotların tayin limiti, membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel farkı meydana getiren en düşük iyon konsantrasyonu olarak tanımlanır. IUPAC (1994)'a göre

tain limiti olarak, tek yüklü anyon ve katyonlara duyarlı elektrotlarda elektrotun sabit potansiyel değerinden ± 18 mV farklılık gösterdiği potansiyel değerine karşılık gelen madde miktarı alınırken, bu potansiyel farkı iki yüklü anyon ve katyonlar için ± 9 mV ve üç yüklü iyonlar için de ± 6 mV olarak kabul edilmiştir [42].

Çoğu iyon seçici elektrot için tain limiti 10^{-6} M civarındadır. Bazılarında ise 10^{-8} M gibi değerler verilmektedir. Bu limitler, ortamda bulunan girişim yapan iyonlar ve moleküller ile ters yönde etkilenebilir.

4.4.4 Doğrusal Çalışma Aralığı

İyon seçici elektrotların doğrusal çalışma aralığı, kalibrasyon eğrisinde veri noktalarının doğrusallıktan 2 mV'dan daha fazla sapmadığı aralık olarak tanımlanır. Bu değer çizilen kalibrasyon grafiklerinden hesaplanabilir. Çalışılan aralıktaki konsantrasyon-potansiyel değişiminin doğrusallığı R^2 değeri ile verilebilir.

4.4.5 Kullanım Ömrü

İyon seçici elektrotlarda kullanım ömrü, Nernst cevabı sergiledikleri süre olarak tanımlanır. Kullanım ömrünün belirlenmesi için, belirli aralıklarla on katlık konsantrasyon değişimlerinde elektrodun sergilediği potansiyel farkları incelenir. Bu potansiyel farklar zamana karşı oluşturulan bir grafiğe geçirilerek eğim belirlenir. Eğimde önemli bir fark meydana gelmediği sürece elektrot güvenli bir şekilde kullanılabilir.

4.4.6 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerde elektrodun uzaklaştırılıp yıkandıktan sonra tekrar çözeltilere daldırılmasıyla sergilediği potansiyel değerlerinin standart sapması olarak verilebilir. Hataların en aza indirilebilmesi ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için tekrarlanabilirlik önemli bir özelliktir.

4.4.7 pH Çalışma Aralığı

İyon seçici elektrotların pH çalışma aralıkları araştırılırken genelde elektrodun seçici olduğu ana iyonun 0,1 M, 0,01 M veya 0,001 M derişimini içeren tampon çözeltiler kullanılır. Tampon çözeltilerin pH'sı genelde 2,0-12,0 arasında değişmektedir. Bu

çözeltilerin potansiyelleri ölçülür ve pH'ya karşı grafiğe geçirilir. Potansiyelde önemli bir değişimin meydana gelmediği pH aralığı elektrodun pH çalışma aralığı olarak alınır [36], [38].

MATERYAL VE METOD

5.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Bitkiler

Tetrahidrofuran (THF), yüksek molekül ağırlıklı polivinilklorür (PVC), o-nitrofeniloktiletler (NPOE), [12, (4-etil fenil) dodesil], potasyumtetrakis(p-kloro)fenilborat (KTpCIPB) ve grafit, Fluka (Bucks, Switzerland) firmasından, epoksi reçinesi (Ultrapur SU 2227 Victor (Italy) firmasından, sertleştirici (Desmodur RFE) Bayer AG (Germany) firmasından, çalışmada kullanılan diğer bütün tuzlar Merck (Darmstadt, Germany) firmasından sağlandı. İyonofor madde olarak kalsiyum iyonofor IV (N,N-Dicyclohexyl-N',N'-dioctadecyl-3-oxapentanamide, (C₅₂H₁₀₀N₂O₃) M_A: 801,37 gr/mol) Merck (Darmstadt, Germany) firmasından tercih edildi.

Çalışmada kullanılan kaktüs bitkileri (E. Candicans) Ertay Tohumculuk Ltd.'ten (İstanbul) temin edilmiştir.

5.2 Kullanılan Cihazlar

Çalışmada ultra saf su cihazı (18.2 MΩ, Purelab flex, ELGA), manyetik karıştırıcı (SB 162 3, Stuart), çok kanallı potansiyometre cihazı ve ilgili yazılımı (ISEMS-4, Medisen) ve analitik terazi kullanılmıştır. Potansiyometrik ölçümlerde referans elektrot olarak Ag/AgCl referans elektrot kullanılmıştır.

5.3 Deneysel Çalışma

Çalışmada kullanılacak elektrotların potansiyometrik performanslarının ölçülmesi için standart katyon çözeltileri kullanılmıştır. Standart katyon çözeltileri, kalsiyum klorür tuzundan hazırlandı. Bütün standart stok çözeltileri deiyonize su ile analitik saflıktaki maddelerden 0,1 M olacak şekilde hazırlanarak istenilen derişimlere seyreltilmiştir.

Bütünöyle katı hal kompozit kalsiyum seçici mikroelektrodun geliştirilmesi katı kontakt ve membran hazırlama safhalarından oluşmaktadır. Elektrotlar hazırlanırken, öncelikle elektrotun en iç kısmını oluşturan katı kontakt karışımı bir bakır tel üzerine kaplandı ve hazırlanan PVC membran kokteylleri daha sonra bu katı kontakt yüzeyine kaplandı.

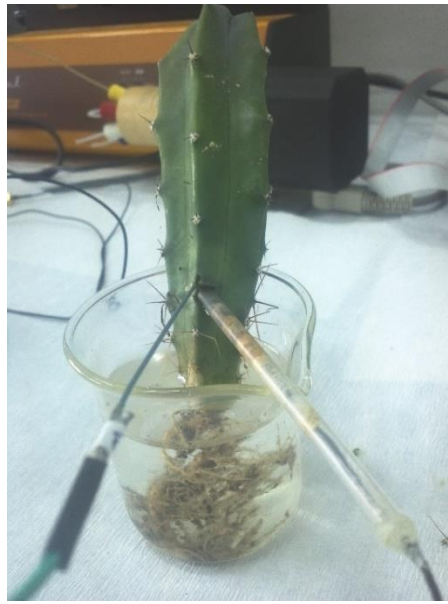
Katı kontaktların karışımı hazırlanırken, ağırlıkça %50 grafit, %35 epoksi reçinesi ve %15 sertleştirici içeren karışım THF çözücüsü içerisinde çözüldü. Uygun viskozite sağlandığında, bir bakır tel (yaklaşık 0,4-0,5 mm çap ve 5-10 cm uzunlukta) üzerine bu karışım 6-8 defa daldırılarak kaplanır ve oda sıcaklığında bir gece bekletildi ve kullanıma hazır hale getirildi. En uygun olduğu belirlenen membran bileşimi olarak %2 (w/w) aktif madde (kalsiyum iyonofor IV), %68 (w/w) plastikleştirici (NPOE), %29 (w/w) PVC, %1(w/w) KTpCIPB kompozisyonuna sahip bir membran çözeltisi (300 mg) hazırlandı. Membran kokteyli THF çözücüsü içerisinde (3 ml) iyice karıştırılarak hazırlandı. Katı kontakt daha sonra bu membran kokteyline daldırılarak kaplanması sağlandı ve kullanımdan önce 10^{-2} M CaCl_2 çözeltisi içerisinde 5-24 saat bekletilerek şartlandırıldı.



Şekil 5.1 Üretilen kalsiyum seçici elektrotlar

Hazırlanan Ca^{2+} seçici mikroelektrotların potansiyometrik davranışları, seçicilikleri (seçicilik katsayıları ayrı çözelti metoduyla hesaplandı), cevap zamanları, kullanım ömürleri, tayin limitleri ve pH çalışma aralığı araştırıldı.

Elektrotların performansı belirlendikten sonra, bitkiler üzerinde çalışma aşamasına geçildi. Toplam 4 kaktüs bitkisinden 1 adedi kontrol, 2 adedi NaCl tuzluluğu stresi ve 1 adedi de soğuk şokuna maruz bırakılarak soğuk stresi tespiti için kullanıldı. Bitkilerin hepsi, çalışma başlamadan önce aynı koşullarda tutuldu. Bitkiler hidroponik ortama alınarak üzerlerine ksilemle bağlantılı olacak şekilde birbirine mümkün olduğunca yakın birer adet referans ve çalışma elektrotları yerleştirildi.



Şekil 5.2 Kaktüs bitkisine yerleştirilmiş kalsiyum seçici ve referans elektrotlar

Soğuk stresi ölçümü yapılan bitki, 20 °C sıcaklıktan alınıp ani olarak -20 °C sıcaklıktaki ortama yerleştirilerek 10 dk boyunca düşük sıcaklığa maruz bırakıldı ve daha sonra tekrar 20 °C sıcaklıktaki ortamda elektrotlar yerleştirilmek suretiyle potansiyometrik ölçüm yapıldı.

Tuzluluk stresi ölçümü yapılan bitkiler için, öncelikle hidroponik ortama alınıp elektrotları yerleştirildikten sonra ölçüme başlandı. Belli bir sabit potansiyel elde edildikten sonra her iki bitki besin çözeltisine de toplam 150 mM konsantrasyonda olacak şekilde NaCl eklendi.

Tüm bitkiler için ölçümler 27-50 saat aralıksız devam ettirildi.

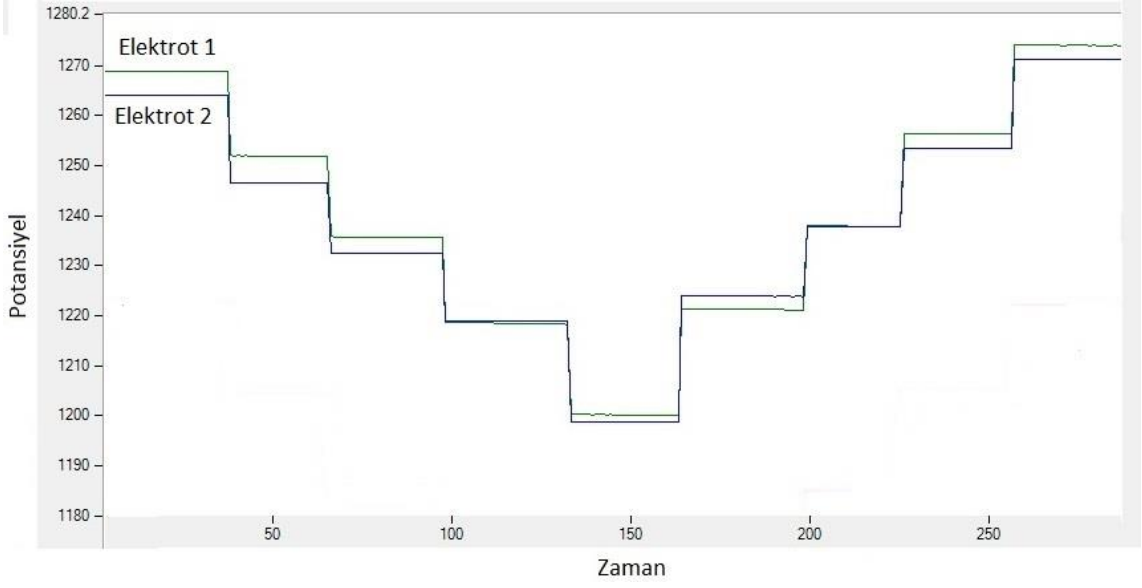
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir önceki bölümde anlatılan yöntemle ve her elektrot için aynı yöntem kullanılarak çok sayıda sensör hazırlandı. Özdeş sensörlerden en iyi performansı sergileyen sensör seçilerek potansiyometrik performans özellikleri ortaya konulmuştur.

6.1 Elektrot Performansı

Hazırlanan elektrotun potansiyometrik davranışı, konsantrasyonu 10^{-6} - 10^{-1} M arasında değişen standart katyon (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+}) çözeltileri kullanılarak test edildi. Hazırlanan elektrotların, diğer iyonlar yanında Ca^{2+} iyonuna karşı seçici olduğu, hızlı ve tekrarlanabilir cevap sergilediği gözlemlenmiştir.

Şekil 6.1'de, 10^{-5} - 10^{-1} M konsantrasyon aralığındaki standart Ca^{2+} çözeltilerine (düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona ve sonra tekrar düşük konsantrasyona doğru) sırasıyla daldırılan özdeş elektrotların potansiyometrik davranışı görülmektedir.

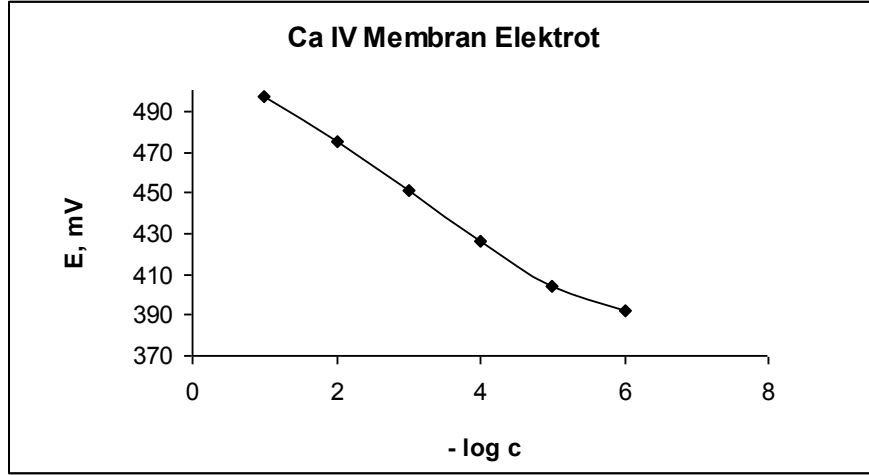


Şekil 6.1 Özdeş elektrotlara ait potansiyel-zaman grafikleri

Elektrodun performans özellikleri aşağıda verilmiştir.

6.1.1 Tayin Limiti

Yapılan ölçümler sonunda tayin limitinin $3,26 \times 10^{-6}$ M olduğu hesaplanmıştır.

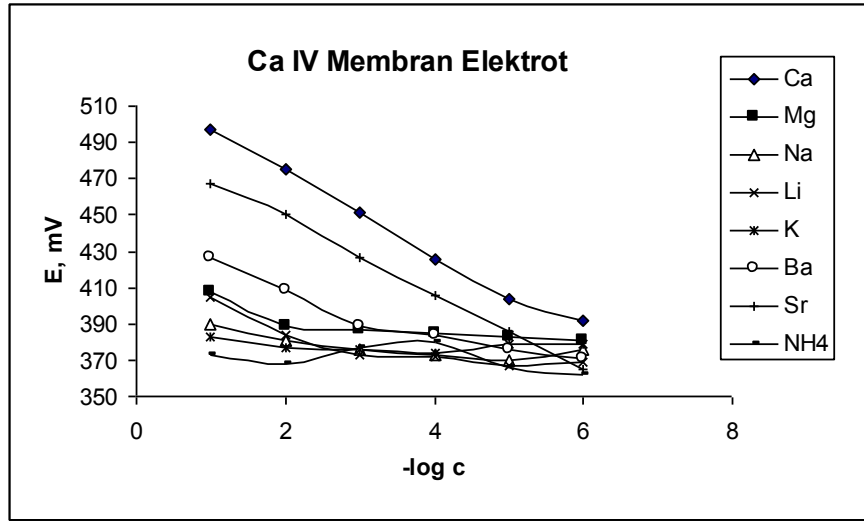


Şekil 6.2 Ölçümlerde kullanılan elektrotların tayin limiti grafiği

6.1.2 Seçicilik Sabitleri

Seçicilik sabiti ölçümleri yapılırken girişim yapan iyonların 10^{-6} - 10^{-1} M arasında değişen standart katyon çözeltileri hazırlandı. Daha sonra, Ca^{2+} -Seçici PVC-Membran elektrot ile ana iyon çözeltisinin ve girişim yapan iyon çözeltilerinin potansiyometrik ölçümleri

alındı. Ca^{2+} -Seçici PVC-Membran elektrotun farklı iyonlara karşı sergilediği potansiyometrik davranış Şekilde verilmiştir.



Şekil 6.3 Elektrotun farklı iyonlara karşı sergilediği potansiyometrik davranış

Bu çalışmada girişim yapan iyonun 10^{-2} M'lık çözeltisinde ölçülen potansiyele eşit potansiyel veren ana iyon çözeltisinin konsantrasyonu belirlenip SSM (seperate solution method)'a göre seçicilik sabiti hesaplanmıştır.

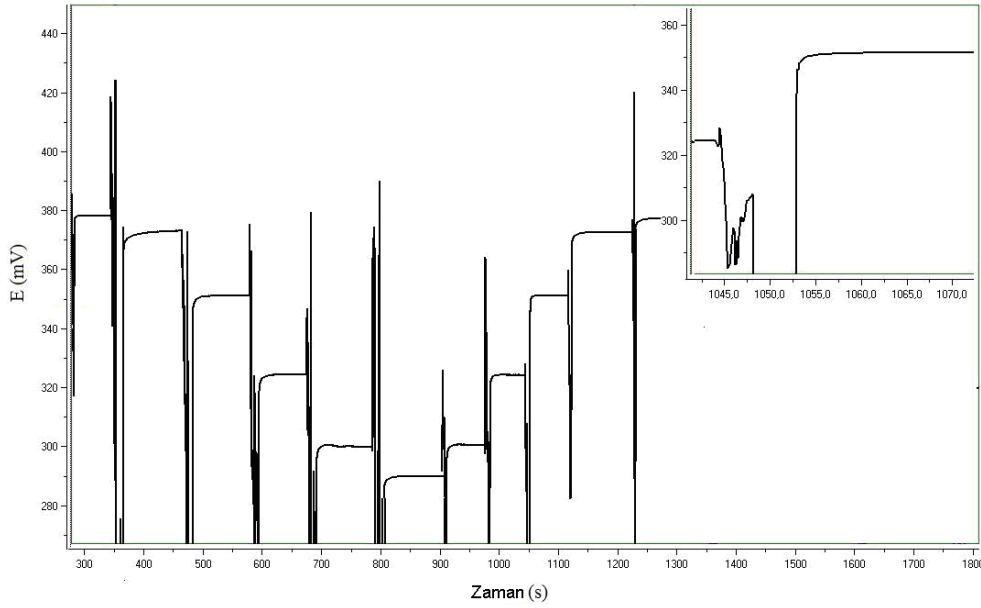
Çizelge 6.1 Elektrotlar için hesaplanan seçicilik sabitleri

Girişim Yapan İyon	$K_{i,j}$	$\log K_{i,j}$
Mg^{2+}	$2,39 \times 10^{-4}$	-3,62
Na^+	$1,09 \times 10^{-4}$	-3,96
K^+	$7,38 \times 10^{-5}$	-4,13
Li^+	$1,47 \times 10^{-4}$	-3,83
NH_4^+	$3,06 \times 10^{-5}$	-4,51
Sr^{2+}	$9,43 \times 10^{-2}$	-1,02
Ba^{2+}	$1,70 \times 10^{-3}$	-2,77

Çizelgeden de anlaşılacağı gibi hazırlanan Ca^{2+} -Seçici PVC-Membran elektrot, diğer iyonların yanında Ca^{2+} iyonuna karşı oldukça seçicidir.

6.1.3 Cevap Zamanı

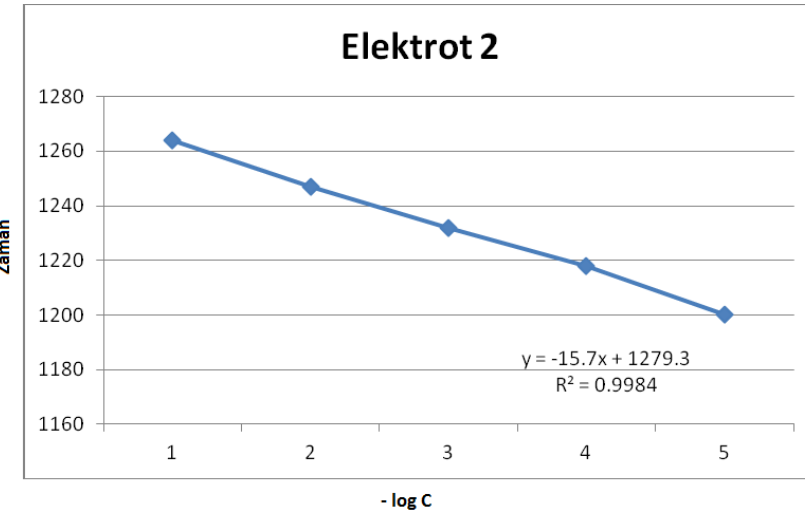
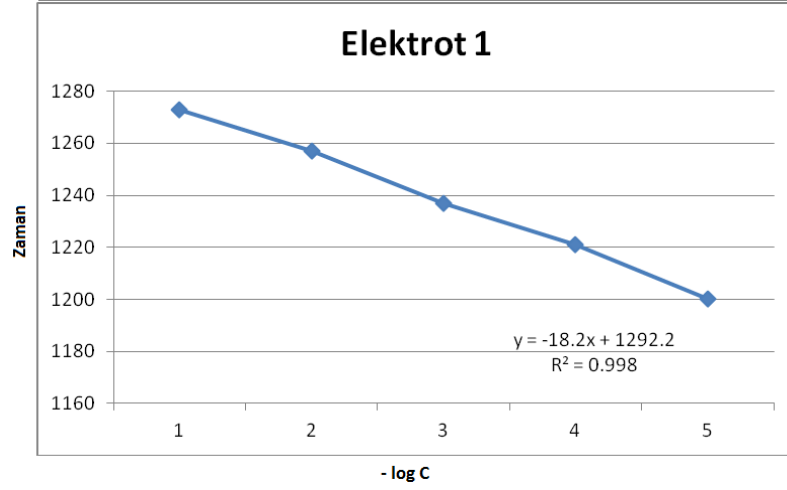
Şekilde görüldüğü gibi elektrot sırasıyla 10^{-1} M - 10^{-6} M standart kalsiyum çözeltilerine ve 10^{-6} M - 10^{-1} M standart kalsiyum çözeltilerine daldırılarak ölçümler alınmıştır. 10^{-4} M Ca^{2+} çözeltisinden 10^{-3} M Ca^{2+} çözeltisine geçişte elektrotun potansiyelinin dengeye gelme zamanının %95'ine denk gelen süre hesaplanarak cevap zamanı bulunmuştur. Cevap zamanı, $t_{95} < 6$ s olup çok kısadır.



Şekil 6.4 Ca^{2+} -Seçici PVC-Membran elektrotun cevap zamanı

6.1.4 Doğrusal Çalışma Aralığı

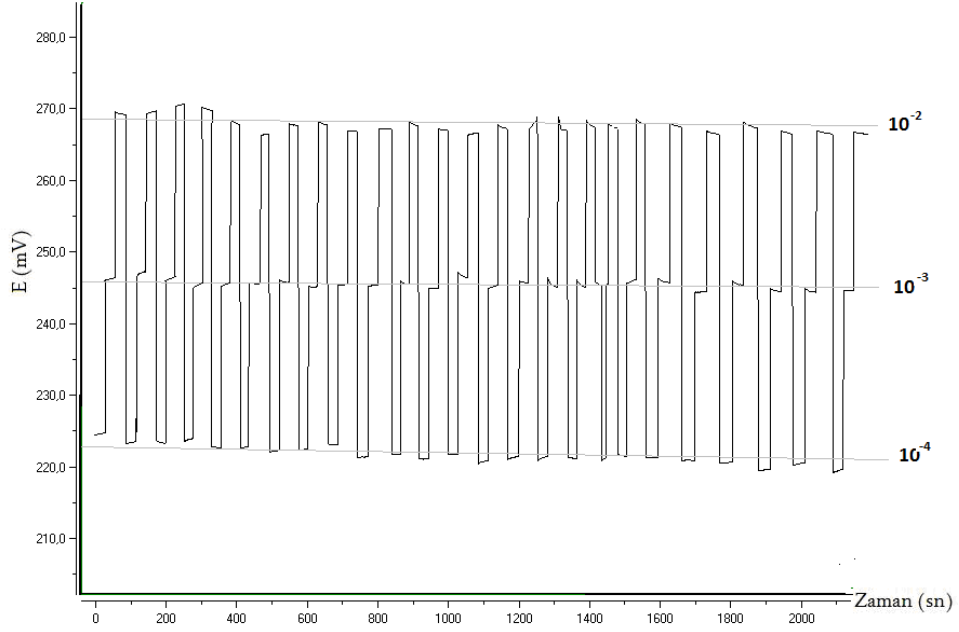
Elektrotun doğrusal çalışma aralığı 10^{-1} ile 10^{-5} M arasında değişmektedir. Elektrot bu konsantrasyonlar arasında doğrusal bir davranış göstermekte olup elde edilen doğrunun denklemi ve R^2 değeri Şekil 6.5 üzerinde verilmektedir.



Şekil 6.5 Ölçümlerde kullanılan elektrotların doğrusal çalışma aralığı

6.1.5 Tekrarlanabilirlik

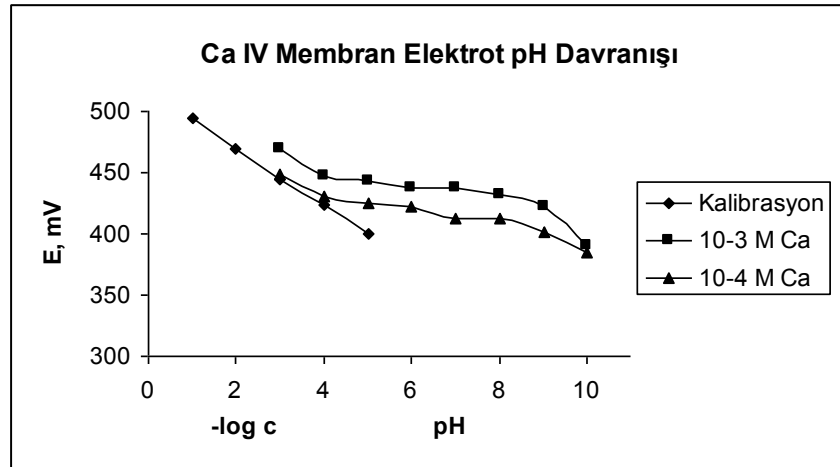
Elektrot, 10^{-4} , 10^{-3} , ve 10^{-2} M lık kalsiyum çözeltilerine sırayla 25 defa daldırılmış ve herbir ölçümden sonra potansiyometrede yaklaşık aynı potansiyel değerleri okunmuştur. Bu durum elektrotun tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu bir göstergesidir.



Şekil 6.6 Ca²⁺-Seçici PVC-Membran elektrotun tekrarlanabilirliği

6.1.6 pH Çalışma Aralığı

Hazırlanan elektrotun pH çalışma aralığı; pH'sı 3–10 arasında değişen 10⁻³ M ve 10⁻⁴ M sabit Ca²⁺ miktarı içeren 5x10⁻³ M fosfat tamponu çözeltilerinde alınan ölçümlerle belirlenmiştir. Şekilde görüldüğü gibi pH arttıkça sabit olması gereken potansiyel değerleri bir miktar azalmakta fakat pH=4–9 aralığında elektrot ortam pH'sından çok fazla etkilenmeden çalışabilmektedir. İlk olarak elektrot, 10⁻¹ M -10⁻⁶ M standart kalsiyum çözeltilerine daldırılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş, daha sonra hazırlanan tampon çözeltilerinde ölçüm alınarak pH davranışı gözlemlenmiştir.



Şekil 6.7 Ca²⁺-Seçici PVC-Membran elektrotun pH çalışma aralığı

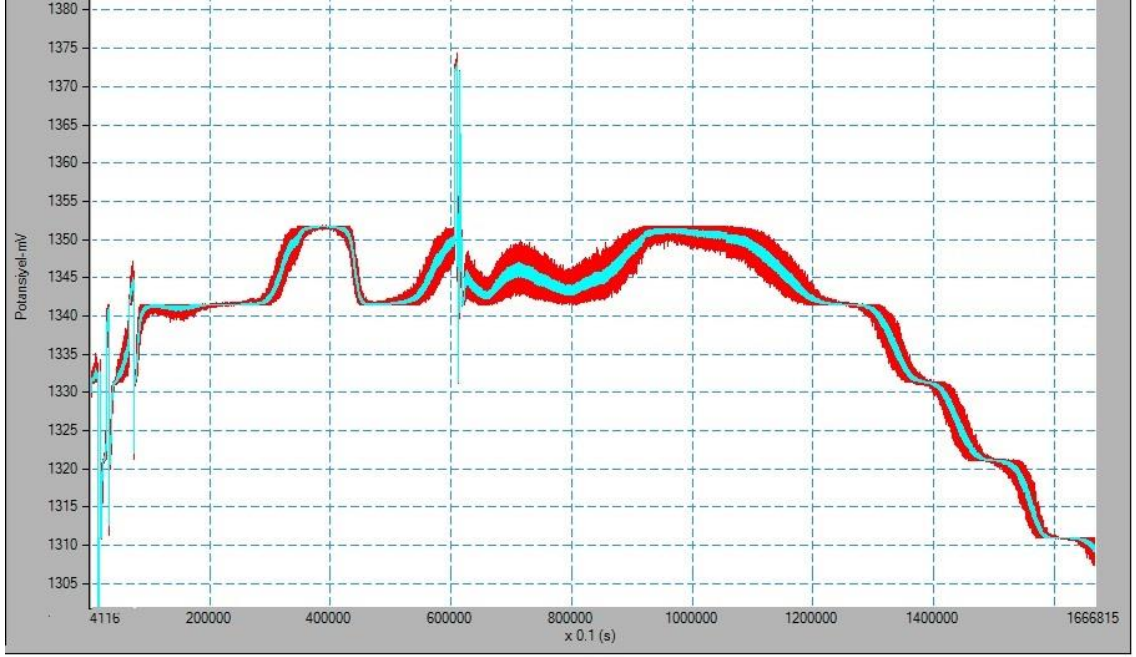
Hazırlanan Ca^{2+} -Seçici PVC-Membran elektrot pH=4 ile pH=9 arasında belirgin bir potansiyel değişimi göstermemektedir.

6.2 Bitkilerde Kalsiyum Takibi Sonuçları

Bu kısımda incelenen grafiklerde, potansiyeldeki artış kalsiyum konsantrasyonunda artışa ve potansiyel değerindeki azalma da kalsiyum konsantrasyonunda azalmaya işaret etmektedir. Her bir deneyde kullanılan elektrot, potansiyel-konsantrasyon ilişkisini kendine özgü şekilde etkilemektedir. Elektrot 1, her 10 kat kalsiyum konsantrasyon değeri değişimine karşılık 18.2 mV potansiyel değişimi göstermektedir. Elektrot 2 ise, kalsiyum konsantrasyonundaki her 10 kat değişime karşılık 15.7 mV potansiyel değişimi göstermektedir.

6.2.1 Soğuk Şoku

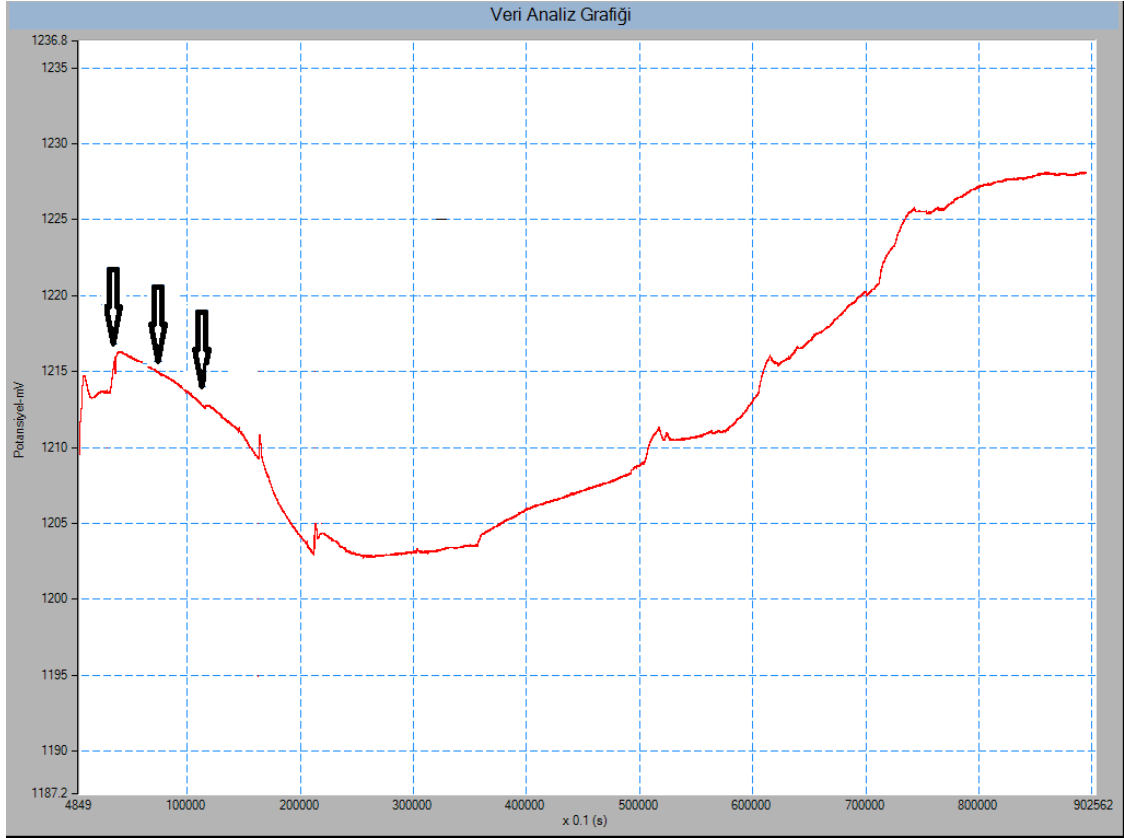
Bitkinin soğuk stresine cevabını ölçmek amacıyla Elektrot 1 kullanılmıştır. Bitki, şoka maruz bırakıldıktan hemen sonra gövdede yara açılıp referans ve çalışma elektrotları yerleştirilmek suretiyle incelenmiştir. Şekil 6.8 incelendiğinde, kısa süre sabit ilerleyen bitki ksilem kalsiyum değerinde ilk olarak 1-1,5 saat içerisinde 10 mV değişim, yani yaklaşık 5,5 katlık bir artış görülmüştür. Daha sonra bir süre sabit kalan kalsiyum değeri, yaklaşık 20. saate kadar birbirini takip eden 2,5-5 katlık artma ve azalmalar şeklinde dalgalanmalar göstermiştir. 20 saatten sonra kalsiyum değerinde yaklaşık 1,5 saatlik periyotlarda 6'şar kat olmak üzere düzenli ve sürekli bir azalma görülmüştür.



Şekil 6.8 Soğuk şoku, 0,2-27. saatler arasında ölçülen potansiyel değerleri

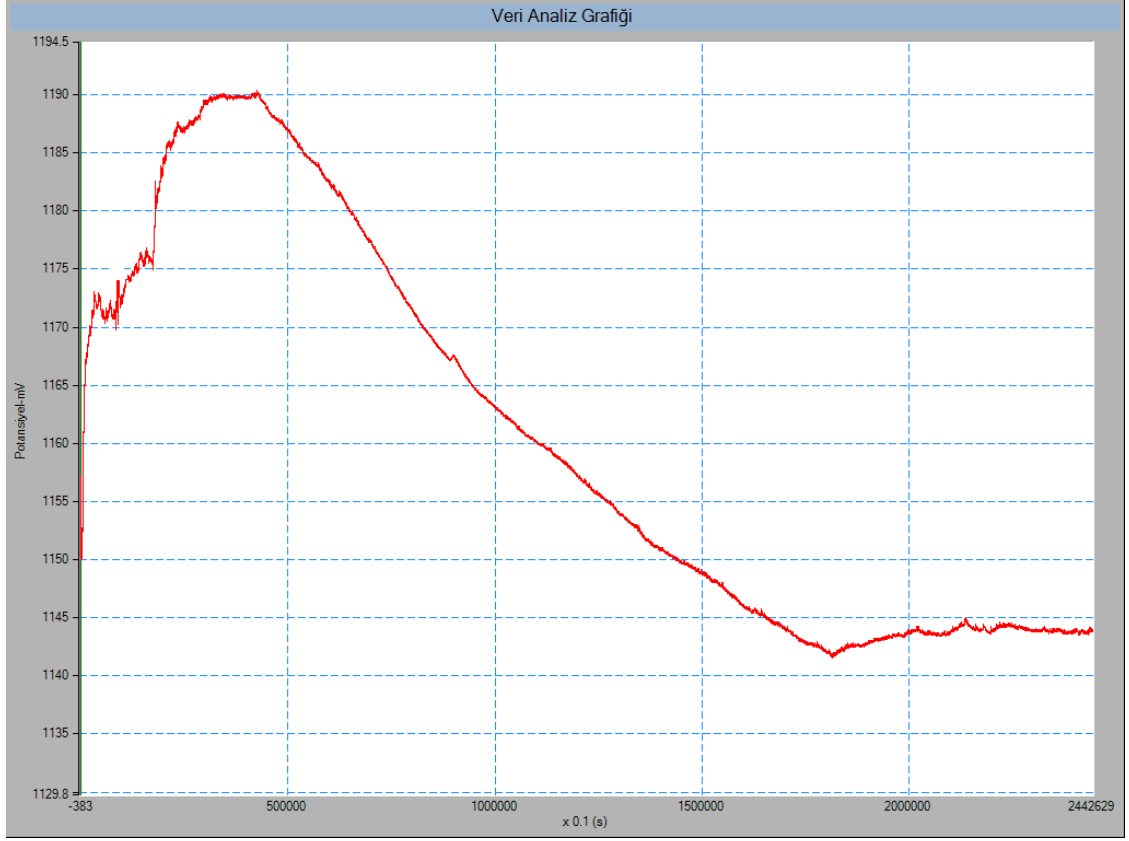
6.2.2 Tuzluluk

Bitkinin tuz stresine cevabını ölçmek amacıyla yapılan her iki ölçümde de Elektrot 2 kullanılmıştır. İlk ölçüm için, elektrotlar yerleştirildikten sonraki 2. saatte 50 mM NaCl çözeltisi elde edecek miktarda NaCl, bitkinin besin çözeltisine eklenmiştir. Daha sonra 3 ve 4. saatlerde ortamdaki NaCl konsantrasyonu sırayla 100 ve 150 mM seviyesine çıkarılmıştır. NaCl ilk eklendiği andan itibaren ($t=2$ saat) yaklaşık 5 saat boyunca, ksilem kalsiyum konsantrasyonunda sürekli bir azalma (toplam 9-10 kat) tespit edilmiştir. Daha sonraki 5 saat süresince sabit bir kalsiyum konsantrasyon değeri okunmuştur. Takip eden 12 saatte kalsiyum konsantrasyonu düzenli ve sürekli bir artış göstermiş ve $t=24$. saatte toplam 15-16 kat artışla maksimum konsantrasyonuna ulaşmıştır. 24-27. saatler arasındaki değerler yaklaşık olarak sabittir (Şekil 6.9).



Şekil 6.9 NaCl stresi, 0-27. saatler arasında ölçülen potansiyel değerleri

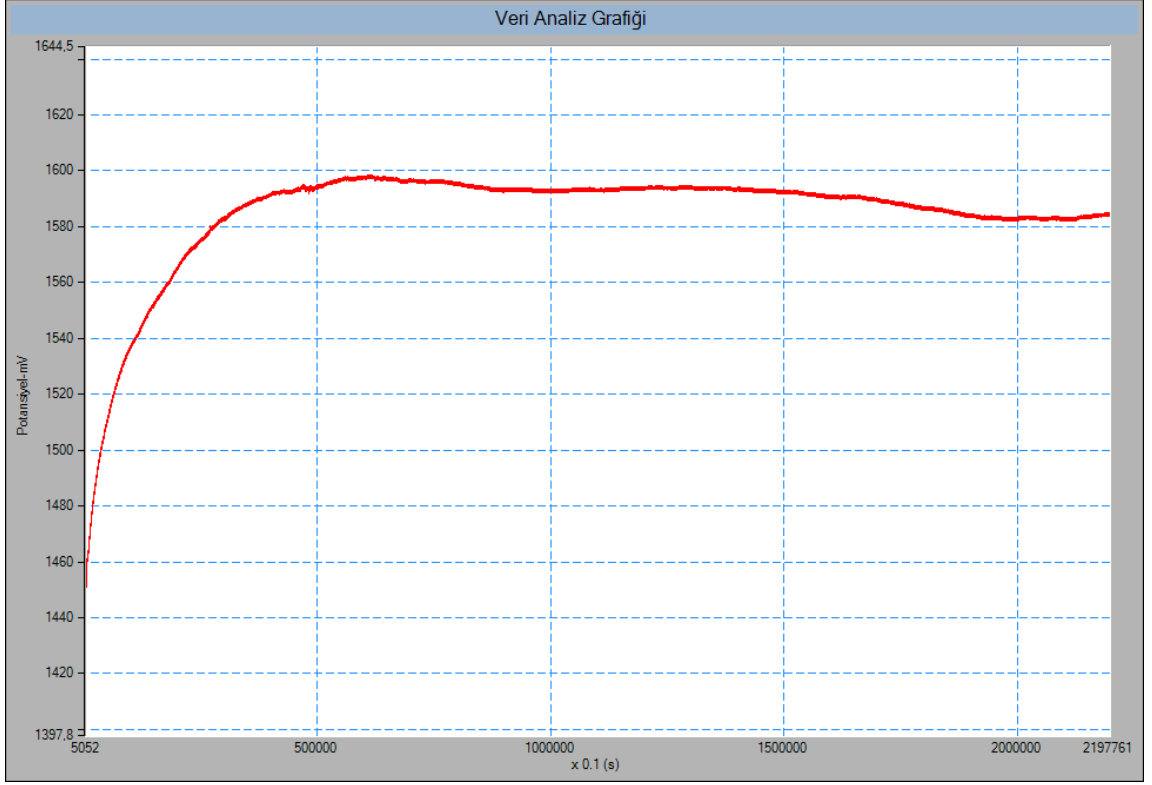
Şekil 6.10'da, besin çözeltisindeki NaCl konsantrasyonu $t=0$ anında 150 mM olacak şekilde tuzluluğa maruz bırakılan kaktüs bitkisinin ksilem kalsiyum konsantrasyonundaki değişim görülmektedir. Elektrotlar yerleştirildikten sonra, kalsiyum konsantrasyonunda yaklaşık 6 saat boyunca hızlı bir yükseliş göze çarpmaktadır (12-12,5 kat). Sonraki 3 saatte hemen hemen sabit ve maksimum değerinde bir konsantrasyon okunmuştur. Takip eden 27 saat boyunca sürekli olarak ve büyük oranda (yaklaşık 30 kat) bir düşüş ve minimum değerden sonra 4 saat süresince hafif bir yükseliş (1-1,5 kat) görülmüştür. Daha sonraki 10 saat süresince konsantrasyon değeri sabit bir seyir izlemiştir.



Şekil 6.10 150 mM NaCl, 0-50. saatler arasında ölçülen potansiyel değerleri

6.2.3 Kontrol

Bu deneyde Elektrot 1 kullanılmıştır. Bu elektrot, her 10 kat kalsiyum konsantrasyon değeri değişimine karşılık 18.2 mV potansiyel değişimi göstermektedir. Kontrol amaçlı olarak kullanılan kaktüs bitkisi ksileminde, elektrotların yerleştirilmesinin ardından 12 saat boyunca giderek azalan oranda ama sürekli bir potansiyel artışı kaydedilmiştir. Söz konusu artış yaklaşık 135 mV olarak görülmektedir ki, bu da kalsiyum konsantrasyonunda yaklaşık 72 kat artış anlamına gelmektedir. Kalan 38 saat süresince değişim çok hafif seyretmiş ve 50. saatte okunan konsantrasyon değerinin maksimum değerden yaklaşık 7 kat az, başlangıç değerinden 65 kat fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 6.11 Kontrol bitkisine ait kalsiyum elektrot potansiyel değerleri (0-50 saat)

6.3 Tartışma

Deneyler sonucu elde edilen sonuçlar bir bütün olarak incelendiğinde, ilk olarak göze çarpan birkaç nokta vardır.

- Elektrotlar yeterli performansla çalışmaktadır ve diğer iyonlardan minimum seviyede etkilenmektedir.
- Hangi koşul altında olursa olsun, istisnasız olarak potansiyel ve dolayısıyla kalsiyum konsantrasyonlarında ilk birkaç saatte önemli artışlar görülmüştür.
- Tuzluluk stresi ölçümlerinde bitkilerde genel olarak, ksilem kalsiyum konsantrasyonunda (ilk artışın ardından) önce büyük bir düşüş, daha sonra ise bir miktar artış olmuştur.
- Soğuk stresi ölçümünde, ksilem kalsiyum konsantrasyonunda dalgalanmalar ve bunu düzenli aralıklarla takip eden büyük bir düşüş görülmüştür.

Bu noktada, altı önemle çizilmesi gereken bir husus vardır. Bitki hücrelerindeki sitozolik kalsiyum konsantrasyonu, mekanik uyarılar ve yaralanmalara karşı hızlı bir yükseliş

gösterir. Ancak bu yükselişte kullanılan kalsiyum kaynağı birincil olarak hücre içi depolardır. Bu nedenle yaralanma sonucunda ksilem kalsiyum konsantrasyonunda önemli bir değişim meydana gelmesi beklenmez. Ancak bitkinin yaralanmaya karşı yanıtlarının, lokal ve sistemik kalsiyum konsantrasyonunda dolaylı yoldan nasıl bir değişime neden olabileceği ve hatta bir değişime neden olup olmadığı net değildir. Deneyde kullanılan tüm bitkilerde, elektrot yerleştirme amaçlı olarak benzer büyüklükte yaralar açılmıştır. Bitkilerin hepsinde ilk birkaç saatte kalsiyum konsantrasyonlarında değişen oranlarda artış gözlenmiştir. Ancak, kontrol bitkisinde gözlenen 72 kat gibi çok büyük orandaki kalsiyum konsantrasyon artışının tek nedeni olarak yaralanmayı göstermek güçtür. Bununla birlikte, söz konusu artışa tam olarak neyin neden olduğu bilinmemektedir.

Tuzluluk stresi, ksilemdeki kalsiyum konsantrasyonunu birkaç yoldan etkiler. Yüksek sodyum konsantrasyonu, kalsiyum alımını sınırlayarak ksilem değerinde düşmeye sebep olabilir. Ayrıca bitki sinyal iletim mekanizmaları tuzluluk stresiyle harekete geçer ve giderek artan sayıda bu durumdan etkilenen hücre, birincil olarak apoplast ve vakuoller aracılığı ile sitozol kalsiyum konsantrasyonlarını artırır. Dolayısıyla ksilemdeki kalsiyum konsantrasyonunda saatler süren bir azalma görülmesi muhtemeldir. Bitkinin bundan sonraki davranışı tolerans gösterip göstermemesine göre değişebilir. Tolerans gösteren bitkiler, hücre membranlarındaki iyon pompaları aracılığı ile fazla sodyumu dışarı atar. Ayrıca köklerden sodyum alımı sınırlandırılır. Sodyum miktarının azalması ile sitozolden apoplasta ve hücre içi depolara kalsiyum atılımı paralel olarak gözlenebilir. Bütün bu bilgiler göz önüne alındığında, tuzluluk stresi uygulaması yapılan kaktüslerin her ikisi için de kalsiyum aracılıklı sinyal mekanizmalarının harekete geçirilerek tuzluluk stresine karşı direnç gösterildiği ve bunun elektrotlar vasıtasıyla takip edilebildiği; yani bu iki bitkide stres sinyallerinin tespit edilebildiği söylenebilir.

Soğuk şoku uygulaması yapılan bitkinin ksileminde, uzun bir süre boyunca kalsiyum dalgalanmaları olarak isimlendirilebilecek bir durum ortaya çıkmıştır. Normalde, bitkilerin soğuk şokuna maruz kalmaları durumunda sitozol kalsiyum konsantrasyonlarında dalgalanmalar görülmektedir. Başlangıçtaki artış, sıcaklık değişimi kaynaklı elektrot potansiyelindeki artıştan kaynaklanıyor olabilir. Daha sonraki dalgalanmalar ise stres sonucu meydana gelen hücre içi kalsiyum konsantrasyonları

değişimlerini yansıtabileceği gibi, bitki besin ortamında sodyum gibi kalsiyum alımını kısıtlayıcı elementlerin miktarları yüksek olmadığından, bitkinin ortamdan kalsiyum alarak kullanması ve bu olayın tekrarlanması sonucunda da gerçekleşmiş olabilir. Deneyin sonlarına doğru tespit edilen kalsiyum düşüşlerinin sebebi bilinmemektedir.

Sonuç olarak, kalsiyum seçici elektrotların bitki stresinin erken tespitinde kullanılabilir oldukları söylenebilir. Ancak bu durumun sınırlarının doğru bir şekilde anlaşılabilmesi için, farklı yöntemlerin kullanımıyla desteklenen daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- [1] Sankaran, S., Mishra, A., Ehsani, R., Davis, C. (2010). "A Review of Advanced Techniques for Detecting Plant Diseases", *Computers and Electronics in Agriculture*, 72: 1-13.
- [2] Kaplan, B., Davydov, O., Knight, H., Galon, Y., Knight, M., Fluhr, R., Fromm, H. (2006). "Rapid Transcriptome Changes Induced by Cytosolic Ca²⁺ Transients Reveal ABRE-Related Sequences as Ca²⁺-Responsive cis Elements in Arabidopsis", *The Plant Cell Online*, 18(10): 2733-2748.
- [3] Patterson, G., (2010), *Calcium Nutrition in Plants*, http://www.calciumproducts.com/Calcium_Nutrition_in_plants.pdf, 10 Eylül 2015.
- [4] Manzoor, H., (2012). *Calcium Signaling in Plant Defense: Involvement of Subcellular Compartments and Glutamate Receptors*, Doktora Tezi, Université de Bourgogne, Dijon, Fransa.
- [5] Sterling, T. M., (2004), *Transpiration – Water Movement through Plants*, <http://croptechnology.unl.edu>, 13 Ekim 2015.
- [6] Riedell, W., Schumacher, T., *Transport of Water and Nutrients in Plants*, <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C10/E5-24-04-05.pdf>, 14 Ekim 2015
- [7] Clarkson, D. T., (1993). "Roots and The Delivery of Solutes to The Xylem", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 341: 5–17.
- [8] Chen, J., Gutjahr, C., Bleckmann, A., Dresselhaus, T., (2015). "Calcium Signaling during Reproduction and Biotrophic Fungal Interactions in Plants", *Molecular Plant*, 595-611.
- [9] Martins, T., Evans, M., Woolfenden, H., Morris, R., (2013). "Towards the Physics of Calcium Signalling in Plants", *Plants*, 2: 541-588.
- [10] Murphy, A., (2011). *The Plant Plasma Membrane*, Springer Verlag, 142, Heidelberg.
- [11] McAinsh, M. R., Pittman, J. K., (2009). "Shaping The Calcium Signature", *New Phytol.*, 181: 275-294.

- [12] White, P., Broadley, M., (2003). "Calcium in Plants", *Annals of Botany*, 92: 487-511.
- [13] Lindsay, W. L., (1979). *Chemical Equilibria in Soils*. The Blackburn Press, Caldwell, NJ.
- [14] Yıldız, M., Terzi, H., (2007). "Bitkilerin Yüksek Sıcaklık Stresine Toleransının Hücre Canlılığı ve Fotosentetik Pigmentasyon Testleri ile Belirlenmesi", *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23 (1-2): 47 - 60
- [15] Rejeb, I., Pastor, V., Mauch-Mani, B., (2014). "Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms", *Plants*, 458-475.
- [16] Jenks, M., (2005). *Plant Abiotic Stress*, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- [17] Yılmaz, E., Tuna, L. A., Bürün, B., (2011). "Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirilen Tolerans Stratejileri", *C. B. Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (1): 47-66.
- [18] Çulha, Ş., Çakırlar, H., (2011). "Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları", *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11-34.
- [19] Parida, A.K., and Das, A.B., (2005). "Salt Tolerance and Salinity Effects on Plants: A Review", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324-349.
- [20] Bakır, M., (2012). *Asma Çeşit ve Anaçlarında Kuraklık ve Tuz Stresi Toleransına Yönelik Mikrodizin Analizleri ve Stres İle İlgili Transkriptomların Tespiti*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- [21] Shanker, A. K., Venkateswarlu, B., (2011). *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*, Intech, Croatia.
- [22] Benlioğlu, K., Bitki Patojeni Bakteriler, http://web.adu.edu.tr/user/kbenlioglu/DERSLER_files/Fitopatojen%20Bakteri.pdf, 18 Mart 2015.
- [23] Baykal, N., Kovancı, B., (2000). *Bitki Koruma*, Anadolu Üniversitesi, Yayın No: 902, Eskişehir.
- [24] Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., Van Wees, S. C. M. (2009). "Networking by Small-Molecule Hormones in Plant Immunity", *Nat. Chem. Biol.*, 5: 308- 316.
- [25] Aktaş, L., Güven, A., (2005). "Bitki Savunma Sistemlerinde Hormonal Sinyal Moleküller ve Çapraz-İletişimleri", *Çankaya Üniversitesi Journal of Arts and Sciences*, 3:1-12.
- [26] Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, arsiv.agri.ankara.edu.tr/bitkikoruma/10016_bitkikorumauygulama.doc, 9 Mayıs 2015.
- [27] Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi, Fitopatoloji, <http://ormanweb.sdu.edu.tr/dersler/hlehtijarvi/fitopatoloji.pdf>, 19 Mayıs 2015.

- [28] Fang, Y. L., Ramasamy, R. P., (2015). "Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection", *Biosensors*, 4: 537-561.
- [29] Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ. C., Sipahioğlu, H. M., (2011). "Bitki Virüslerinin Tanılanmasında Kullanılan Serolojik Yöntemler", *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 2: 35-49.
- [30] Hull, R., (2009). *Comparative Plant Virology*, Second Edition. Elsevier Academic Press London, UK.
- [31] López, M.M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Corris, M.T., Llop, P., Renyalver, R., Cambra, M., (2003). "Innovative Tools for Detection of Plant Pathogenic Viruses and Bacteria", *Int. Microbiol.*, 6: 233-243.
- [32] Mahlein, A.K., Oerke, E., Steiner, U., Dehne, H., (2012). "Recent Advances in Sensing Plant Diseases for Precision Crop Protection", *Eur. J. Plant Pathol.*, 133: 197-209.
- [33] Chaerle, L., Leinonen, I., Jones, H.G., Van Der Straeten, D., (2007). "Monitoring and Screening Plant Populations with Combined Thermal and Chlorophyll Fluorescence Imaging", *J. Exp. Bot.*, 58: 773-784.
- [34] Frasco, M.F., Chaniotakis, N., (2009). "Semiconductor Quantum Dots in Chemical Sensors and Biosensors", *Sensors*, 9: 7266-7286.
- [35] Sadanandom, A., Napier, R.M., (2010). "Biosensors in plants", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13: 736-743.
- [36] Topçu, C., (2012). *Bor Duyarlı Elektrot Geliştirilmesi, Toprak ve Su Sistemlerinde Bor Ölçümü İçin Uygulanması*, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [37] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th Edition, Saunders College Publishing, Rinehart and Winston Inc. USA.
- [38] Rundle, C. C., (2015). *A Beginners Guide to Ion-Selective Electrode Measurements*, <http://www.nico2000.net/Book/Guide1.html>, 20 Nisan 2015
- [39] Isildak I., Covington A. K., (1993). "Ion-Selective Electrode Potentiometric Detection in Ion-Chromatography", *Electroanalysis*, 5: 815-824.
- [40] Covington A. K., (1974). "Ion-Selective Elektrodes", *Anal. Chem.*, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 355-406.
- [41] Kwon K. H., Paeng K.J., Lee D. K., Lee I. C., Hong U. S., Cha G. S., (1994). "Neutral Carrier-based Ion-Selective Electrode with Similar Sensitivity to Different Monovalent Cations as a Detector in Ion Chromatography", *Journal of Chromatography A*, 688: 350-356.
- [42] IUPAC, Analytical Chemistry Division, Commission on Electroanalytical Chemistry, (1994). "Recomendations for Nomen-clature of Ion-selective Electrodes", *Pure Appl. Chem.*, 66: 2527-2536.

- [43] IUPAC, (2000). "Potentiometric Selectivity Coefficients of Ion-selective Electrodes", *Pure and Applied Chemistry*, 72: 1851–2082.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mustafa NİĞDE
Doğum Tarihi ve Yeri : 19.11.1988 Tuzla
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mnigde@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2011
Lise	Sayısal	Kocaeli Körfez Fen Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2014 - ...	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Proje

1. Araştırmacı, Seralarda Bitki Hastalıklarının Erken Tespiti İçin Kalsiyum ve Salisilik asit Seçici Sensörlerin Geliştirilmesi ve Uygulanması, TAGEM, 2014-2016.
2. Araştırmacı, Farklı Atık Su Kaynakları Kullanılarak Yeni ve Etkin Mikroalg Yetiştirme Sistemi Tasarımı ve Biyoyakıt Üretimi, İSTKA, 2014-2015.
3. Araştırmacı, Diyaliz Hastaları İçin Taşınabilir Fosfat, Üre ve pH Ölçüm Sisteminin Geliştirilmesi, TÜBİTAK 1512, 2015.
4. Araştırmacı, Bitki Hastalıklarının Tespiti İçin Kalsiyum Seçici Sensörün Kullanılabilirliğinin Araştırılması, YÜLAP, 2015-2016.
5. Araştırmacı, Stereolithographic Technique for Complete Denture Fabrication, TÜBİTAK 1509 – MANUNET, 2015-2018.