



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SARI PAS ENFEKSİYONUNA DİRENÇLİ BUĞDAY  
(*Triticum aestivum* L.)’DA PROTEOMİK ANALİZLER**

**Cihan İNAN**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**I. Danışman**

**Prof.Dr. Nazlı ARDA**

**II. Danışman**

**Dr. Semra HASANÇEBİ**

**Mayıs, 2012**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SARI PAS ENFEKSİYONUNA DİRENÇLİ BUĞDAY  
(*Triticum aestivum* L.)’DA PROTEOMİK ANALİZLER**

**Cihan İNAN**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**I. Danışman**

**Prof.Dr. Nazlı ARDA**

**II. Danışman**

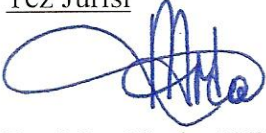
**Dr. Semra HASANÇEBİ**

**Mayıs, 2012**

**İSTANBUL**

2601100232 Öğrenci numaralı Cihan İNAN tarafından hazırlanan bu çalışma 20/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Nazlı ARDA (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Avni KURU  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ercan ARICAN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Filiz GÜREL  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN  
Marmara Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 18818 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca, benden desteğini esirgemeyen, değerli bilgi ve tecrübelerini sürekli benimle paylaşan, bana her türlü destek ve yardımda bulunan değerli hocam birinci tez danışmanım **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya ve çalışmanın TÜBİTAK, MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirilmesini sağlayan, her aşamada sonsuz bir sabır, özveri ve inançla yanımda olan, yardım ve katkılarını esirgemeyen ikinci tez danışmanım ve değerli hocam **Dr. Semra HASANÇEBİ**'ye teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmemde benden bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü araştırmacılarından **Dr. Ahmet Tarık Baykal**'a, çalışmalarımı kolaylaştıran **Rahmi Büyükkeskin**'e, çalışma arkadaşlarım **Dilara Maytalman** ve **Sertan Çevik**'e teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans öğrenimim boyunca hiçbir zaman benden yardımlarını esirgemeyen **Dr. Evren Önay Uçar**'a ve **Dr. Murat Pekmez**'e, İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyeleri ve araştırmacı arkadaşlarıma; tüm TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü çalışanlarına yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, beni bu günlere getiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen **AİLEM**'e, her türlü konuda manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana olan inancını her zaman hissettiren **Burcu Kesik**'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Gen Teknolojileri Laboratuvar'ında yürütülmekte olan TÜBİTAK tarafından desteklenen 109T293 numaralı COST projesi ve İstanbul Üniversitesi BAP birimi tarafından 18818 no'lu tez projesi olarak desteklenmiştir

Mayıs, 2012

Cihan İNAN

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vi
SEMBOL LİSTESİ .....	vii
ÖZET .....	ix
SUMMARY .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>2</b>
2.1. BUĞDAY .....	2
2.2. BUĞDAYDA PAS HASTALIKLARI .....	4
2.3. BUĞDAYDA SARI PAS HASTALIĞI .....	5
2.3.1. Sarı Pasla Mücadele Yöntemleri.....	8
2.3.2. Sarı Pas Dayanıklılığının Moleküler Mekanizması .....	9
2.3.2.1 Hücre Duvarının Güçlendirilmesi.....	13
2.3.2.2 İyon Akışında Değişimler .....	14
2.3.2.3 Oksidatif Patlama .....	15
2.3.2.4 Transkripsiyonel Yeniden Programlama (Savunma Genlerinin Aktivasyonu) .....	16
2.3.2.5 Programlı Hücre Ölümü .....	18
2.4 SARI PAS ARAŞTIRMALARINDA MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR.....	18
2.4.1 Genomik Yaklaşım.....	18
2.4.2 Transkriptomik Yaklaşım .....	19
2.4.3 Proteomik Yaklaşım .....	21
2.5 İKİ BOYUTLU SIVI KROMATOĞRAFİSİ (2D-LC) .....	22
2.5.1 Birinci Boyutta Ayırım .....	23
2.5.2. İkinci Boyut Ayırım.....	25
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
3.1. BİTKİ MATERYALİNİN HAZIRLANMASI.....	27
3.1.1. Bitki Materyali.....	27

3.1.2. Patojen Kaynağı.....	28
3.1.3. Bitkilerin Enfekte Edilmesi.....	29
3.1.4. Enfeksiyon Cevabının Mikroskopik Olarak İncelenmesi.....	30
3.1.5. Enfeksiyon Cevabının Makroskopik Olarak İncelenmesi.....	31
3.2. PROTEİN ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI .....	32
3.2.1. Protein İzolasyonu .....	32
3.2.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	34
3.3. ELEKTROFORETİK ANALİZLER .....	35
3.3.1. Jelin Hazırlanması.....	35
3.3.2. Proteinlerin Jele Yüklenmesi .....	36
3.3.3. Jelin Boyanması .....	37
3.4. PROTEİNLERİN SIVI KROMATOĞRAFI SİSTEMİ (PF2D) İLE İKİ BOYUTLU AYIRIMI.....	37
3.4.1. Cam Malzemelerin Hazırlanması .....	38
3.4.2. Solüsyonların Hazırlanması .....	38
3.4.3. PF2D Cihazının Hazırlanması.....	39
3.4.4 Protein Örneklerinin Yüklemeye Hazır Hale Getirilmesi .....	42
3.4.5. Protein Örneklerinin PF2D Sistemine Yüklenmesi ve Örneklerin Birinci ve İkinci Boyutta Ayırımı.....	42
3.4.6. Kromatogram Verilerinin Analizi .....	43
3.5. PROTEİNLERİN TANIMLANMASI.....	44
3.5.1 Kütle Spektrometrik Analizler İçin Örnek Hazırlığı.....	44
3.5.1.1. <i>Tripsinizasyon işlemleri</i> .....	44
3.5.1.2. <i>Triptik Peptidlerin Temizlenmesi ve MS Analizi için Hazırlanması</i> .....	47
3.5.2. Kütle Spektrometrik (nanoLC-ESI-MS/MS) Analizler.....	498
3.5.3. Verilerin Biyoinformatik Analizi .....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1 PROTEİN İZOLASYONU .....	53
4.2 PROTEİN KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	53
4.3. ELEKTROFORETİK ANALİZLER .....	53
4.4 PF2D İLE PROTEİNLERİN 2 BOYUTLU AYIRIMI.....	54
4.4.1 Kromatogram Verilerine Dayanarak Sanal Jel Haritalarının Oluşturulması.....	60
4.4.2 Enfekte ve Kontrol Örneklerinin Karşılaştırılması .....	61
4.5 PROTEİNLERİN TANIMLANMASI.....	62
4.5.1. Seçilen Piklerin Bulunduğu Fraksiyonlarda SDS-PAGE Analizi.....	62
4.5.2. Kütle Spektrometrik Analizler .....	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ .....	106

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Ülkemizin en çok üretilen tarımsal ürünleri arasında buğdayın yeri .....	3
Şekil 2.2	: Ülkemizin dünya buğday üretimindeki yeri .....	3
Şekil 2.3	: Sarı pas hastalığının morfolojisi ve tohum verimine etkisi .....	6
Şekil 2.4	: Ülkemiz ve yakın çevresinde sarı pas hastalığından etkilenen bölgeler .....	7
Şekil 2.5	: Bitki ve patojen arasındaki etkileşimi ve ardından gelişen savunma cevabını gösteren zigzag modeli .....	11
Şekil 2.6	: Bitki patojen etkileşiminde uyumsuz ilişki sonucu dayanıklılık cevabının gelişimi .....	12
Şekil 2.7	: Beckman Coulter PF2D Sistemi .....	23
Şekil 2.8	: Birinci boyut kolonunda proteinlerin pI noktalarına göre ayırımı .....	25
Şekil 2.9	: İkinci boyut kolonunda proteinlerin hidrofobitesine göre ayırımı .....	26
Şekil 3.1	: İzgi 2001 çeşidi buğday örnekleri .....	27
Şekil 3.2	: Patojen sporlarının enfeksiyon için hazırlanması .....	29
Şekil 3.3	: Bitki materyalinin hazırlanış aşamaları .....	30
Şekil 3.4	: Yapılan inokülasyon çalışmalarında enfeksiyon cevabının mikroskopik olarak görüntülenmesi .....	31
Şekil 3.5	: Dayanıklı ve hassas çeşitlerin makroskopik görüntüsü .....	32
Şekil 3.6	: Beckman Coulter PF2D sistemi ve bileşenlerinin şematik gösterimi .....	40
Şekil 3.7	: C18 kolon içeren ZipTip pipet ucu .....	48
Şekil 3.8	: Waters SYNAPT HDMS kütle spektrometri sistemi .....	49
Şekil 4.1	: Tez çalışmasında izlenen tüm aşamaların şematik gösterilişi .....	52
Şekil 4.2	: Üç biyolojik tekrarda, kontrol ve enfekte buğday yapraklarından inokülasyonu takiben izole edilen total proteinlerin SDS-PAGE jelindeki bant profilleri .....	54
Şekil 4.3	: Kontrol/enfekte örneklerin 1. boyut ayırımlarında oluşturulan pH gradientleri .....	55
Şekil 4.4	: Birinci boyut kromatogramlarının üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen değerlendirme grafiği .....	56
Şekil 4.5	: pH ve UV-1 kromatogramlarının çakıştırılması sonucu ikinci boyut ayırımı yapılacak fraksiyonların belirlenmesi .....	58
Şekil 4.6	: UV-2 kromatogramlarının kontrol/enfekte olacak şekilde çakıştırılarak değerlendirilmesi .....	59
Şekil 4.7	: Birinci boyut ve ikinci boyut verileri kullanılarak oluşturulan 2 boyutlu sanal jel haritası .....	60
Şekil 4.8	: Doksanaltıncı saate ait biyolojik tekrarlar arasındaki 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması .....	61
Şekil 4.9	: DeltaVue yazılımı ile enfekte/kontrol sanal jel haritaları çakıştırılarak anlatım düzeyi farklı proteinlerin seçilimi .....	62



<b>Şekil 4.10</b>	: Birden fazla protein piki içerdiği görülen fraksiyonlarda yapılan SDS-PAGE analizi .....	<b>63</b>
<b>Şekil 4.11</b>	: Tanımlaması yapılan proteinlerin fonksiyonlarına göre ayrıldığı 8 gruba göre dağılımları.....	<b>76</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3.1</b>	: İzgi 2001 çeşidine ait özellikler .....	28
<b>Tablo 3.2</b>	: Protein izolasyonu için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları.....	33
<b>Tablo 3.3</b>	: BSA standartlarının hazırlanması .....	35
<b>Tablo 3.4</b>	: Protein örneklerinin jele yüklenmesi ve yürütme işlemi için gerekli tamponlar .....	37
<b>Tablo 3.5</b>	: Jelin boyanması için gerekli boyaların içeriği ve hazırlanışı.....	37
<b>Tablo 3.6</b>	: PF2D 1. boyut analizleri için solüsyonların içeriği ve hazırlanışı.....	39
<b>Tablo 3.7</b>	: PF2D 2. boyut analizleri için solüsyonların içeriği ve hazırlanışı.....	39
<b>Tablo 3.8</b>	: Doğrudan tripsinizasyon için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları .....	45
<b>Tablo 3.9</b>	: Jel analizi sonrası tripsinizasyon için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları.	47
<b>Tablo 4.1</b>	: Yirmidördüncü saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler .....	64
<b>Tablo 4.2</b>	: Kırksekizinci saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler .....	67
<b>Tablo 4.3</b>	: Yetmişikinci saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler .....	69
<b>Tablo 4.4</b>	: Doksanaltıncı saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler .....	72
<b>Tablo 5.1</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan fungal proteinler.....	81
<b>Tablo 5.2</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan savunma proteinleri.....	84
<b>Tablo 5.3</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan fotosentetik proteinler.....	86
<b>Tablo 5.4</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan gen ekspresyon proteinleri.....	87
<b>Tablo 5.5</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan protein metabolizması proteinleri .....	88
<b>Tablo 5.6</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan metabolizma proteinleri.....	90
<b>Tablo 5.7</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan elektron transport proteinleri.....	91
<b>Tablo 5.8</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan yapısal proteinler.....	92

## SEMBOL LİSTESİ

<b>APS</b>	:Amonyum persülfat
<b>AFLP</b>	:Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
<b>ATAE</b>	:Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
<b>Avr</b>	:Avirülens
<b>BT</b>	:Başlangıç tampon
<b>CPA</b>	:Faaliyete göre Ürünlerin Sınıflanması Classification of Products by Activity
<b>EST</b>	:Ekspres Edilmiş Sekans
<b>EST-SSR</b>	:Ekspres Edilmiş Sekans Etiketleri-Kısa Dizi Tekrarları
<b>ET</b>	:Elüsyon tampon
<b>ETI</b>	:Eftörle Tetiklenmiş Bağışıklık - Effector Triggered Immunity
<b>ETS</b>	:Eftörle Tetiklenmiş Hassasiyet - Effector Triggered Susceptibility
<b>FAO</b>	:Food and Agriculture Organization of the United Nations - BM Gıda ve Tarım Örgütü
<b>GMBE</b>	:Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
<b>HISS</b>	:Yüksek iyonik tuz solüsyonu - High ionic salt solution
<b>HPCF</b>	:Yüksek performanslı kromatofokus fraksiyonlama - High performance chromatofocusing fractionation
<b>HPLC</b>	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
<b>HPRF</b>	:Yüksek performanslı ters faz - High performance reverse phase
<b>HR</b>	:Hipersensitif cevap - Hypersensitive Response
<b>ITIS</b>	:Integrated Taxonomic Information System - Bütünleştirilmiş Taksonomik Bilgi Sistemi
<b>JA</b>	:Jasmonik asit
<b>m/z</b>	:Kütle/yük
<b>MAS</b>	: Belirteç destekli seçim - Marker Assisted Selection
<b>MAMP</b>	:Patojenle İlişkili Moleküler Motifler - Microbe Associated Molecular Patterns
<b>MS</b>	:Kütle spektrometrisi - Mass spectrometry
<b>PAMP</b>	:Patojen ilişkili moleküler motifler
<b>PEG</b>	:Polietilen glikol
<b>PF2D</b>	:Protein fractionation 2 dimensional
<b>pI</b>	:İzoelektrik nokta
<b>PLGS</b>	:ProteoLynx Global Server
<b>PMSF</b>	:Fenilmetansülfonil florür
<b>PR</b>	:Patojenez ilişkili - Pathogenesis related
<b>PRR</b>	:Motif Tanıma Reseptörler - Pattern Recognition Receptors
<b>Pst</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>
<b>PTI</b>	:Patojenle tetiklenmiş immünite
<b>PVPP</b>	:Poli(vinil poli-pirolidon)
<b>RAPD</b>	:Rasgele Artırılmış Polimorfik DNA
<b>RGAP</b>	:Dayanıklılık Gen Analog Polimorfizmi
<b>ROS</b>	:Reaktif oksijen türleri
<b>RuBisCo</b>	:Rubiloz bifosfat karboksilaz

<b>SA</b>	:Salisilik asit
<b>SAR</b>	:Systemic acquired resistance – Sistemik kazanılmış direnç
<b>SDS</b>	:Sodyum dodesil sülfat
<b>SSR</b>	:Kısa Dizi Tekrarları
<b>TAGEM</b>	:Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü
<b>TEMED</b>	:Tetrametiletilediamin
<b>TFA</b>	:Trifloroasetikasit
<b>TÜİK</b>	:Türkiye İstatistik Kurumu
<b>USDA</b>	:Amerika Birleşik Devletleri Tarım Birimi - United States of Department Agriculture
<b>UV</b>	:Ultraviyole
<b>v/v</b>	:Hacim/hacim
<b>w/v</b>	:Ağırlık/hacim
<b>w/w</b>	:Ağırlık/ağırlık
<b>xg</b>	:Rölatif santrifügal kuvvet
<b>Yr</b>	:Sarı pas - Yellow rust
<b>µl</b>	:Mikrolitre
<b>µM</b>	:Mikromolar
<b>2-DE</b>	:2 boyutlu jel elektroforezi
<b>2D-LC</b>	:2 boyutlu sıvı kromatografisi

## ÖZET

### SARI PAS ENFEKSİYONUNA DİRENÇLİ BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA PROTEOMİK ANALİZLER

Türkiye dünyanın 9. büyük buğday (*Triticum aestivum* L.) üreticisidir. Besinsel, ekonomik ve ticari önemi, buğdayı ülkemizin en önemli tarım ürünlerinden biri yapmaktadır. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ekmeklik buğdayda sarı pas hastalığına yol açan biyotrofik bir mantardır. Sarı pas hastalığına karşı geleneksel ıslah çalışmaları yeterli olamamaktadır. Bu nedenle dayanıklı çeşitlerin üretilmesi daha etkili ve çevreci bir stratejidir. Araştırmacılar dayanıklı çeşitler elde etmek için yoğun bir biçimde daha etkin ve hızlı yöntemler araştırmaktadırlar. Buğdayda sarı pas dayanıklılığına ait veriler genel olarak transkriptomik ve genomik yaklaşımlara dayanmaktadır. Daha detaylı sonuçlar elde edilebilecek olmasına rağmen, günümüze kadar bu konuda sadece birkaç proteomik çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, patojen ile inoküle edilmiş, sarı pasa dirençli buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidi İzgi 2001’de dayanıklılıkla ilişkili proteinlerin proteomik tekniklerle belirlenmesidir.

Total proteinler patojen-inoküle ve boş-inoküle (kontrol) edilmiş patojene dirençli bitkilerden 4 farklı zamanda alınan yapraklardan izole edilmiş ve PF2D (“Protein Fractionation 2 Dimensional”) sistemi ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Enfekte ve kontrol örneklerin protein profilleri karşılaştırılıp farklı düzeylerde anlatımı yapılan proteinleri içeren fraksiyonlar nanoLC-ESI-MS/MS sistemi ile analiz edilip tanımlanmıştır.

İnokülasyondan sonra 24, 48, 72 ve 96. saatlerde; kontrole göre farklı anlatım yaptığı belirlenen sırasıyla 33, 24, 34 ve 42 protein tanımlanmıştır. Tanımlanan farklı 77 protein rol aldıkları biyolojik olaylar göz önüne alınarak 8 farklı grupta değerlendirilmiştir. Tanımlanan proteinlerin %14’ünün patojen kaynaklı, %21’inin savunma yanıtı, %21’inin fotosentez, %22’sinin metabolizma, %8’inin gen ekspresyonu, %6’sının elektron transportu ve %4’ünün protein metabolizması ile ilişkili olduğu, %4’ünü ise yapısal proteinlerin oluşturduğu belirlenmiştir.

İnokülasyondan sonraki 24. saat örneklerinde, fungal proteinlerden ubikitin benzeri protein (ATG12), ubikinon biyosentez protein ve E3 ubikitin protein ligaz BRE1; savunma cevabı proteinlerinden patojenez-ilişkili protein 4 (PR-4), PR-1 ve peroksiredoksin Q; protein metabolizması ve gen ekspresyon proteinlerinin büyük çoğunluğu; metabolizma proteinlerinden sistein sentaz ve adenin fosforibozil transferaz; elektron transport proteinlerinden tiyoredoksin M ve yapısal proteinlerden histon H4 ve histon H2A indüklenirken, fotosentetik proteinlerin tamamı indirgenmiştir.

İnokülasyonu takiben 48. saat örneklerinde fungal proteinlerden mitokondriyal iç membran proteaz ATP23 ve tip 1 fosfataz regülatör YPI1; savunma proteinlerinden kalmodulin, Cys peroksiredoksin BAS1, geç embriyogenez baskın protein grup 3, katalaz 1 ve sinyal yollarında görev alan profilin 1; tanımlanan tüm fotosentetik proteinler; gen ekspresyon proteinlerinden ökaryotik translasyon başlatıcı faktör E4-1; metabolizma proteinlerinden S adenozil metiyonin sentaz 1, sedoheptuloz 1,7-bifosfataz ve translasyonel protein; elektron transport proteinlerinin büyük çoğunluğu indüklenirken; yapısal proteinlerden histon H4 indirgenmiştir. Bu evrede protein metabolizması ile ilişkili protein tanımlanmamıştır.

İnokülasyonu takiben 72. saat örneklerinde DNA replikasyon kompleksi GINS protein PSF3 ve sitokrom c; savunma proteinlerinden sinyal iletiminde görev alan profilin 1, taumatin benzeri protein (PR-5), dehidrin, katalaz 2 ve peroksidaz; fotosentetik proteinlerin büyük çoğunluğu; protein metabolizması proteinlerinden protein disülfid izomeraz; elektron transport proteinlerinden ferredoksin ve apositokrom indüklenmiş, metabolizma ile ilişkili proteinlerin büyük çoğunluğu ise indirgenmiştir.

İnokülasyonu takiben 96. saat örneklerinde glukoz N-asetil transferaz 1 ve polycomb benzeri artırıcı protein 1; savunma proteinlerinden PR-5, katalaz 1, katalaz 2, peroksidaz ve glutatyon S transferaz; fotosentetik proteinlerin büyük çoğunluğu; gen ekspresyon proteinlerinden 50S ribozomal protein L9; protein metabolizması proteinlerinden ubiquitin konjuge enzim E2 2; metabolizma proteinlerinden fosfogliserat kinaz ve adenozil fosforibozil transferaz; elektron transport proteinlerinden tiyoredoksin M ve ferredoksin indüklenmiş; yapısal proteinlerden HMG1 2 benzeri protein ise indirgenmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada daha önce buğday-sarı pas etkileşimine ilişkin proteomik düzeyde tanımlanmamış çok sayıda protein tanımlanmıştır. Özellikle bitki savunma cevabında önemli rol aldığı bilinen ve patojen-konukçu etkileşiminde etkin rol oynayan patojenez-ilişkili protein sınıfına ait PR-1, PR-4 ve PR-5 başta olmak üzere oksidatif stres ile ilişkili katalaz, peroksiredoksin ve GST ile sinyal iletiminde rol alan profilin ve kalmodulin tanımlanmıştır. Bu çalışma ile ortaya konulan sonuçların, buğdayda sarı pasa karşı verilen savunma cevabının daha iyi anlaşılmasına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

## SUMMARY

### PROTEOMIC ANALYSES IN YELLOW RUST-RESISTANT WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

Turkey is the 9th biggest producer of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the world. Nutritional, economical and commercial importance of wheat, makes it one of the major crop products of our country. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* is a biotrophic fungus that causes yellow rust disease in common wheat. Striving against yellow rust disease using conventional breeding methods is not sufficient. Therefore development of resistant cultivars has considered to be an effective and environmentally safe strategy. Scientists intensively investigate more efficient and faster methods to obtain resistant cultivars. Data on resistance mechanism of wheat to yellow rust is mainly based on transcriptomic and genomic approaches. Although more detailed results would be expected, only a few study has been evaluated rests upon proteomics, till today.

The aim of this study is to determine the proteins related to resistance against yellow rust in pathogen inoculated local resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar, Izgi 2001 using proteomic methods.

Total proteins were extracted from the leaves of pathogen-inoculated and mock-inoculated (control) pathogen resistant plants in 4 different time points, and fractionated with PF2D (“Protein Fractionation 2 Dimensional”) system. Protein profiles were compared and fractions containing the proteins differed in expression level were furtherly analyzed and identified with nanoLC-ESI-MS/MS system.

After inoculation at the time points 24, 48, 72 and 96th hours; 33, 24, 34 and 42 proteins differed in expression levels compared to control were identified, respectively. These unique 77 proteins were classified into 8 different groups, according to their roles in biological processes. Identified proteins were found to be related to pathogen, defense, photosynthesis, metabolism, gene expression, electron transport and protein metabolism by 14%, 21%, 21%, 22%, 8%, 6%, 4%, respectively whereas 4% of the proteins were detected as structural proteins.

24th hours samples following the inoculation, fungal proteins ubiquitin-like protein (ATG12), ubiquinone biosynthesis protein and E3 ubiquitin protein ligase BRE1; proteins related to defense response pathogenes-related protein 1 (PR-1), PR-4, peroxiredoxin Q chloroplastic and glutathione S transferase; most of proteins related to protein metabolism and gene expression; proteins related to metabolism cysteine synthase and adenine phosphoribosyl transferase; proteins related to electron transport thioredoxin M type from

electron transport and structural proteins histone H4 and histone H2A were found to be induced whereas all of the identified photosynthetic proteins were reduced.

48th hours samples after the inoculation, fungal proteins mitochondrial inner membrane protease ATP23 and type 1 phosphatases regulator YPI1; proteins related to defense response calmodulin, Cys peroxiredoxin BAS1, late embryogenesis abundant protein group 3, profilin 1 and catalase 1; proteins related to metabolism eukaryotic translation initiation factor E4-1 from gene expression proteins; S adenosylmethionine synthase and sedoheptulose 1,7-bisphosphatase; and most of the electron transport proteins and all of the photosynthetic proteins were found to be induced while structural protein histon H4 protein was reduced. No protein metabolism protein was detected in this period.

72nd hours samples after the inoculation fungal proteins DNA replication complex GINS protein PSF3, and cytochrome c; proteins related to defense response profilin 1, catalase 2, dehidrin, peroxidase and thaumatin like protein (PR-5); all of the photosynthetic proteins; protein disulfide isomerase (ERp72) related to protein metabolism; proteins related to electron transport ferredoxin chloroplastic and apocytochrome were found to be induced while most of the metabolic proteins and 50S ribosomal protein L9 chloroplastic related to gene expression proteins were reduced.

96th hours samples after the inoculation fungal proteins glucose N-acetyltransferase 1 and enhancer of polycomb like protein 1; proteins related to defense response PR-5, catalase 1, catalase 2, peroxidase and glutathione S transferase; most of the photosynthetic proteins; 50S ribosomal protein L9 (chloroplastic) related to gene expression proteins; ubiquitin conjugating enzyme E2-2 related to protein metabolism; proteins related to metabolism phosphoglycerate kinase and adenine phosphoribosyl transferase and proteins related to electron transport thioredoxin M type and ferredoxin chloroplastic were found to be induced while HMG1-2 like protein from structural proteins were reduced.

In conclusion, many proteins that have been never reported in wheat-yellow rust interactions with proteomic methods were identified in this study. Especially, PR-1, PR-4 and PR-5 from pathogenesis-related protein class and oxidative stress related catalase 1, catalase 2 and glutathione S transferase; signal transduction related profilin and calmodulin that have important roles in plant defense response were identified. The findings of this study are thought to contribute understanding of the defense response to yellow rust in wheat.



## 1. GİRİŞ

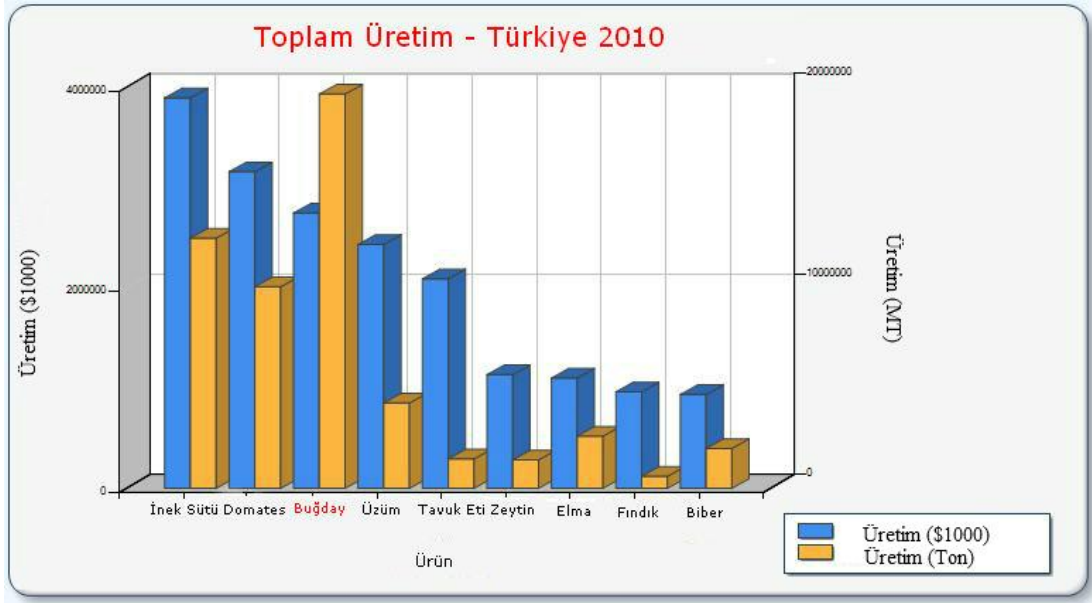
Sarı pas hastalığı, tüm dünyada yaygın biçimde görülen ve buğdayda ciddi verim kayıplarına neden olan bir hastalıktır. Bu nedenle buğdayın bu patojene karşı oluşturduğu dayanıklılığın aydınlatılması konusunda tüm dünyada çok sayıda araştırma yürütülmektedir. Bu konudaki araştırmalar genel olarak, bitki immun sisteminde rol alan gen ve gen ürünlerinin tanımlanması, karakterizasyonu ve işlevinin aydınlatılmasına yönelik genomik ve transkriptomik çalışmalar biçiminde yoğunlaşmaktadır. Oysa bitki immun sistemi sayısız proteinin rol aldığı pek çok biyolojik reaksiyonun katıldığı son derece karmaşık bir süreçtir. Son yıllardaki hızlı teknolojik gelişim sayesinde proteomik çalışmalarla bir canlı sistemde, belirli bir dönemde bulunan tüm proteinlerin tanımlanmalarının yanında yapısal ve işlevsel özellikleri, birbirleri ile olan etkileşimleri ve biyolojik olaylardaki sinyal ağlarının ortaya konulması da mümkün olmaktadır. Bu nedenle de karmaşık biyolojik olayların aydınlatılmasında daha somut veriler elde edilmektedir. Ancak bitki türlerinde karşılaşılan metodolojik sıkıntıların yanı sıra genomik ve proteomik veri tabanlarının diğer organizmalara göre daha sınırlı oluşu nedeniyle proteomiğin sunduğu potansiyel, bitki moleküler biyolojisi alanında daha geç başlamış ve daha sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte son yıllarda artan bir ivme ile kullanımı yaygınlaşmaktadır. Özellikle ülkemizde henüz başlangıç aşamasında olan bitki proteomiği alanında sadece birkaç grup çalışmaktadır.

Sunulan tez çalışmasının amacı, ülkemiz yerel dayanıklı buğday çeşidi, İzgi 2001'de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'nin neden olduğu sarı pas hastalığına karşı bitkinin ortaya koyduğu dayanıklılık cevabının aydınlatılmasına katkıda bulunacak proteom düzeyindeki verileri ortaya koymaktır. Ayrıca son yıllarda tüm dünyada önemi artarak devam eden bitki proteomiği alanında ülkemizdeki çalışmaların yaygınlaşmasına ve güçlenmesine katkı sağlamayı da hedef edinmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

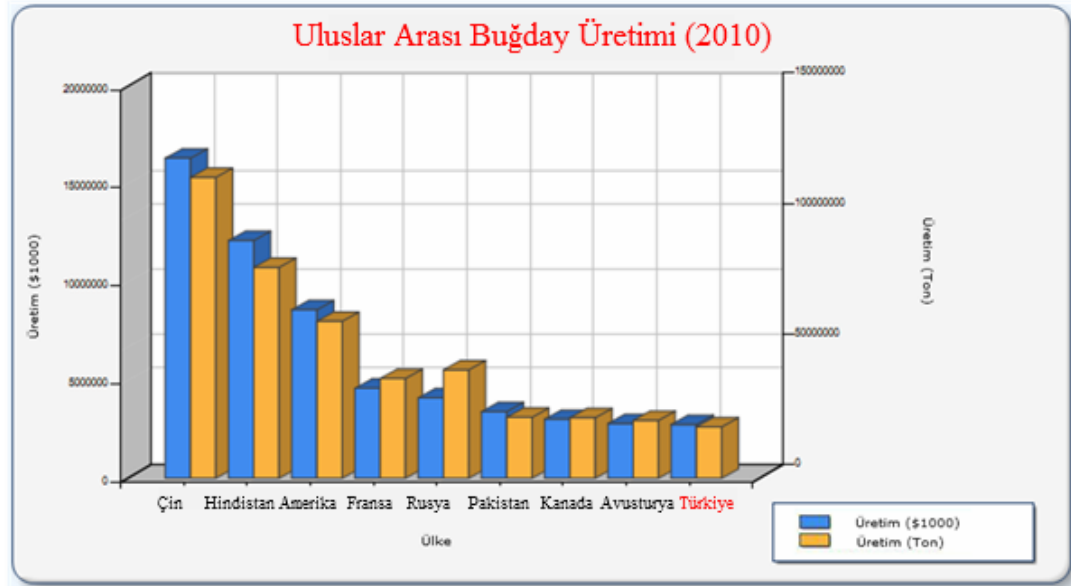
### 2.1. BUĞDAY

Buğday, Bütünleştirilmiş Taksonomik Bilgi Sistemi (Integrated Taxonomic Information System - ITIS) 2010 verilerine göre 21 tür ile temsil edilmektedir. Fakat en çok kültüre edilen türleri; dünyada en çok ekimi yapılan, hekzaploid genoma sahip ekmeklik buğday ve makarnalık buğday olarak da bilinen tetraploid tür olan durum buğdayıdır (Peng ve diğ., 2011). Bunlar arasında ekmeklik buğday olarak da bilinen *Triticum aestivum* L., Cyperales takımına, Poaceae ailesine ve Triticum cinsine aittir (USDA, 2012). Değişik iklim ve toprak koşullarında yetiştirilebilmesi, bileşiminde karbohidrat, nişasta, protein, bazı vitamin ve mineralleri bulundurması, değerli ve ucuz bir besin kaynağı olması bakımından hızla artan dünya nüfusunun beslenmesinde vazgeçilmez bir ürün niteliği taşımaktadır. Mısır ve pirinç ile birlikte dünya nüfusunun yaklaşık %65'inin temel enerji kaynağı olarak dikkat çekmekte; ayrıca tek başına tüm dünyada besinlerden alınan kalorinin %19'unu sağlamaktadır (Todorovska ve diğ., 2009; Atchison ve diğ., 2010). Ülkemizde ise tahıllar beslenmemizin %26.4'ünü kapsarken buğday bu oranın %80'inden fazlasını oluşturmakta, üretim miktarına bakıldığında ise tüm dünyada mısırdan sonra ikinci sırada yer almaktadır. FAO (BM Gıda ve Tarım Örgütü-Food and Agriculture Organization of the United Nations)'nun yayınladığı 2010 verilerine göre ülkemizde buğday üretimi yaklaşık 20 milyon ton ile ilk sırada yer alırken, ekonomik değer açısından 3. sırada yer almaktadır (Şekil 2.1). TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) bitkisel üretim istatistikleri veri tabanında 2010 yılında CPA (Faaliyete göre Ürünlerin Sınıflanması - Classification of Products by Activity) sınıflamasına göre, ülkemizde 67.694.000 dekar araziye buğday ekimi yapılmış, 67.339.888 dekar hasat edilmiş, 16.224.000 ton tarımsal ürün ve 241 kg/da verim elde edilmiştir.



Şekil 2.1: Ülkemizin en çok üretilen tarımsal ürünleri arasında buğdayın yeri (FAO, 2010).

Ayrıca FAO'nun yayınladığı 2010 verilerine göre ülkemiz dünyanın 9. büyük buğday üreticisi konumundadır (Şekil 2.2). Bütün bu veriler incelendiğinde buğdayın ülkemizde hem beslenme hem de ekonomik açıdan çok büyük öneme sahip stratejik bir ürün olduğu açık biçimde görülmektedir.



Şekil 2.2: Ülkemizin dünya buğday üretimindeki yeri (FAO, 2010).

Buğday, yadsınamaz ekonomik öneminin yanında ülkemiz açısından toplumsal ve kültürel, aynı zamanda da tarihi hatta arkeolojik bir değerdir (Bilgiç 2004). Yapılan

evrimsel biyolojik çalışmalarla, kültüre alınmış günümüz buğdaylarının atası olan siyez çeşidinin tarımının başladığı yer olarak Diyarbakır'daki Karacadağ bölgesi gösterilmiştir (Heun, 1998). Bu çalışma, ülkemizdeki buğday dağılımı ve çeşitliliği üzerine kapsamlı araştırmalar yapılması gereğini de ortaya koymuştur. Sahip olduğu geniş bitki örtüsü ve buğdayın yayılımının yaygınlığı göz önüne alındığında; ülkemizin buğday tarihi, gelişimi ve iyileştirilmesi konularında büyük potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalar, Orta Doğu ve ona komşu Akdeniz ve Batı Asya'yı içine alan bölgede 22 yabancı tür ile yayılım gösteren buğdayın, 14 türünün ülkemizde bulunduğunu göstermekte ve bu nedenle ülkemiz, en zengin buğday gen kaynağı merkezi olarak işaret edilmektedir (Bilgiç 2004).

Günümüzde buğday, ekmek, makarna gibi unlu gıda mamülleri ve biyoyakıt gibi çok geniş bir ürün yelpazesinin hammaddesini oluşturmaktadır. Bu yaygın kullanım buğday tarımının geliştirilmesini de beraberinde getirmiştir. Ancak bu amaçla yüzyıllardır sürdürülen ıslah çalışmaları, doğal olarak gen havuzlarında daralmaya yol açmıştır. Daralan gen havuzları, değişen iklim ve çevresel etmenlerin ortaya koyduğu çeşitli stres faktörlerine karşı bitkinin dayanımında dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle zengin ve yabancı gen havuzunda yer alan türler, son derece önemli gen kaynaklarıdır. Bu nedenle ülkemizin bir çok bitki türünde olduğu gibi buğday biyoçeşitliliği de tüm dünyada ilgi gören önemli bir zenginliktir. Yabancı buğday türleri, hem buğdayın ıslahı, yayılışı ve evrimi ile ilgili çalışmalarda hem de günümüzdeki makarnalık ve ekmeklik buğdayların verim ve kalitelerinin artırılması amacıyla yapılan genetik iyileştirme çabalarında büyük önem taşımaktadır (Bilgiç, 2004).

## **2.2. BUĞDAYDA PAS HASTALIKLARI**

Tüm dünyada ve ülkemizde ekilebilir tarımsal alanların, değişen çeşitli iklimsel ve ekolojik etmenlerle her geçen gün daralması, buna karşılık dünya nüfusunun artması birim alandan daha yüksek verimde ürün elde edilmesini zorunlu hale getirmektedir. Diğer tarımsal ürünlerde olduğu gibi buğday üretiminde de biyotik ve abiyotik etmenler birim alandan elde edilen ürün miktarını sınırlayan en önemli etmenlerdir. Tarımsal üretimdeki Ar-Ge çalışmalarının önemli bir kısmını bu etmenlerden

korunma yollarının geliştirilmesi oluşturmaktadır.

Biyotik etmenler arasında, çeşitli hastalıklara yol açan viral, bakteriyel ve fungal patojenler, parazitik bitkiler ve herbivor böcekler yer alırken kuraklık, aşırı sıcak-soğuk ve tuz gibi ekstrem koşullar da abiyotik etmenleri oluşturmaktadır (Corwin ve Lesch, 2005). Bitkiler sürekli bu etmenlerin saldırısına maruz kalmakta ve hem ekonomik hem de ekolojik kayıplar yaşanmaktadır (Pimentel, 1991; Pimentel 2002).

Buğdayda hastalık yaptığı bilinen 40'tan fazla patojenik organizma grubu bulunmaktadır. Fakat bütün bu organizmalar içinde en büyük tehditi pas fungusları içermektedir (Singh ve Huerto-Espino, 2001). *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* kaynaklı **kara pas** (kök pası), *Puccinia triticina* kaynaklı **kahverengi pas** (yaprak pası) ve *Puccinia striiformis* kaynaklı **sarı pas** olmak üzere 3 tür pas hastalığı tanımlanmıştır (Kolmer, 2005).

Ülkemizde sarı pas hastalığı daha çok İç ve Doğu Anadoluda görülürken; kahverengi pas sahil bölgelerinde; kara pas ise Güney, Batı ve İç Anadolu bölgelerinde yaygındır. Oluşan ürün kaybı buğday çeşidinin duyarlılığına, çevre koşullarına, etmenin irkına, görülen bölgeye ve yıl içindeki iklim koşullarına göre değişmektedir (Erzurum Valiliği İl Tarım Müdürlüğü, 2011).

### 2.3. BUĞDAYDA SARI PAS HASTALIĞI

Pas hastalıkları arasında özellikle *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* adlı biyotrofik mantarın etmeni olduğu sarı pas hastalığı, sadece ülkemizde değil, benzer iklim özelliklerine sahip buğday üretimi yapan 60'tan fazla ülkede yaygın olarak görülmekte ve yüksek oranlarda verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır (Li ve diğ., 2006). Hastalık tahılların yaprak, sap ve başaklarını etkilemekle birlikte esas etkisini gösterdiği organ yapraklardır. Hastalık etmeni fungus, enfeksiyon sırasında yaprakların üst yüzeyinde makine dikişi şeklinde ve sarı renkte püstüller oluşturduğu için literatürde **sarı pas** veya **çizgi pası** olarak isimlendirilmektedir. Sarı pas etmeni daha serin iklim koşullarında gelişebildiğinden hastalık vejetasyonun erken dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. Bu durum hastalıktan kaynaklanan verim ve kalite

kayıplarını daha da artırmaktadır. Kahverengi pas hastalığı 15-20°C’de, kara pas hastalığı ise 20-25°C’de daha iyi gelişebilmektedir. Bu sıcaklık derecelerine ulaşıldığı dönemler bitkide vejetasyonun ileri dönemlerine denk geldiğinden daha az zarar meydana gelmektedir. Oysa sarı pas, kahverengi ve kara pas ile kıyaslandığında erken dönemde gelişmesi nedeniyle diğer iki pas türüne göre çok daha büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalık bitki gelişiminde çok erken evrede başlayıp gelişme süreci boyunca devam eder. Etmenin oluşturacağı verim kaybı; bitkinin enfeksiyonla karşılaşma zamanı, buğday çeşidinin hassasiyeti, hastalığın süresi ve hastalık gelişme oranına bağlı olarak %10 ile %100 arasında olabilmektedir (Chen, 2005).

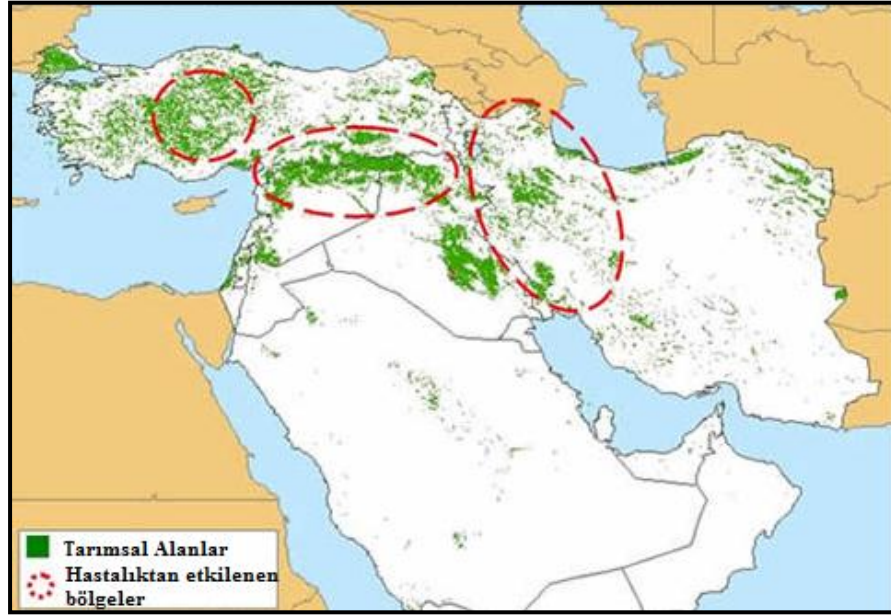
Sarı pas yaprakta; açık sarı renkli, yaprak damarlarına paralel olacak şeritler şeklinde dizilen püstülleriyle karakterize edilmektedir (Şekil 2.3). Bu uzun püstüller ince ve farklı boyutlarda olabilir. Püstül geliştikçe hastalığa rengini veren açık sarı sporlar görünür hale gelir. Hastalık süreci boyunca püstüllerin etrafındaki dokular koyu sarı renk almaya başlar ve kavruk bir görünüm oluşur. Ayrıca klorozis olayından dolayı yapraklarda da renk değişikliği gözlenir (Marsalis ve Natalie, 2006).



Şekil 2.3: Sarı pas hastalığının morfolojisi ve tohum verimine etkisi.

Bahar aylarında, özellikle soğuk ve nemli havalarda etmen gelişmeye ve aktif sporlanan lezyonlar oluşturmaya başlar. Genellikle 10-15°C sıcaklık ve %100 bağıl nem oranı sporun bitki üzerinde çimlenmesi için ideal koşullardır. Etmen, bitki dokusu içinde çok düşük sıcaklıklarda dahi canlılığını koruyabilmekle birlikte

20°C'lik sıcaklığın üzerine çıkıldığında inhibe olmaktadır (Chen, 2005). Hastalık ilkbaharda ilk olarak yaprakların üst yüzeylerinde makine dikişine benzer sarı-turuncu renkli püstüller ile kendini gösterir. Sıra sıra dizilmiş olan bu püstüllerin içinde patojenin yazlık sporları meydana gelir. Oluşan bu sporlar rüzgar ile çevreye dağılır ve uygun koşullara sahip olan diğer bölgelerdeki buğday bitkilerini enfekte ederek yayılır (Erzurum İl Tarım Müdürlüğü, 2011). Patojenin rüzgarla kilometrelerce taşındığı, hatta okyanusları, kıtaları aştığı, böylece kısa sürede çok geniş alanlarda yayılım gösterdiği bilinmektedir (Todorovska ve diğ., 2009). Ülkemizde sarı pas hastalığı daha çok İç ve Doğu Anadolu bölgelerinde görülmekle beraber hastalık buğday ekili alanlarımızın büyük bir kısmını tehdit etmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Ülkemiz ve yakın çevresinde sarı pas hastalığından etkilenen bölgeler (USDA- Amerika Birleşik Devletleri Tarım Birimi, 2010)

Sarı pas hastalığının son 20 yılda ülkemizde oluşturduğu epidemiy ve kayıplar çok çarpıcıdır. Örneğin; baharın serin ve nemli sürdüğü 1998 yılında incelenen tarlaların %98'inin enfekte olduğu belirlenmiştir. Özellikle Gerek 79 çeşidinin ekildiği alanlarda oldukça yüksek düzeyde epidemiy oluşturduğu tespit edilmiştir (Düşünceli ve diğ., 2000). Son 20 yılda ortaya çıkan en yüksek verim kaybına yol açan epidemilerden biri 1995 yılında Çukurova'da görülmüştür. Yağış miktarının yüksek olması ve buğday yetiştirilen alanlarda baskın olarak tek bir buğday çeşidi olarak sarı

pas hastalığına hassasiyet gösteren Seri 82 çeşidinin yetiştirilmesi zararın büyümesine neden olmuştur. Bu epidemi nedeniyle Adana’da 1994 yılında ortalama verim 3860 kg/ha iken, epideminin olduğu, 1995 yılında 2950 kg/ha’ya düşmüştür. Ortalama ürün kaybı %23.6’dır. Bununla birlikte zarar Seri 82 çeşidinin ekildiği tarlalarda %16.8’den %56.2’ye kadar çıkmış olup ortalama kayıp %39.6 olarak belirlenmiştir. Zarar sadece verimle sınırlı kalmamış aynı zamanla gıda sanayisine de yansımıştır (Mamluk ve diğ., 1997). Epidemilerin ağır yaşandığı dönemlerde bazı türler üretimden kaldırılmıştır. Örneğin 1978 yılındaki sarı pas epidemisi, Köse 220/39, Sürak 1593/51 ve Sivas 111/33 gibi bazı çeşitlerin, 1995 yılındaki sarı pas epidemisi ise Güney Anadolu’da (Çukurova) Seri 82 çeşidinin üretimden kaldırılmasına neden olmuştur. Gerek 79 çeşidinin üretim alanları 1994, 1997, 1998, 2009, 2010 ve 2011 yıllarında görülen sarı pas epidemileri sonucunda ise önemli ölçüde sınırlandırılmıştır.

### **2.3.1. Sarı Pasla Mücadele Yöntemleri**

Tarımsal ürünlerin verim ve kalitesindeki kayıpların önlenmesi ya da en aza indirgenmesi amacıyla yapılan çalışmalar, genellikle biyotik ve abiyotik stres etmenlerinin neden olduğu zararlılara karşı yürütülen klasik tarımsal mücadele yöntemlerini ve dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesini kapsamaktadır (Alam, 2004).

Tüm dünyada sarı pas hastalığı ile mücadelede genel olarak fungusit uygulamaları, dayanıklı çeşitlerin ekimi ve yeni çeşitlerin geliştirilmesi çalışmaları yapılmaktadır. Fungusit uygulaması, çevre kirletici etkisi, beklenen başarıyı sağlamaması ve üretim maliyetini artırması gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca fungusit kullanımı, çiftçide sağlık problemleri ve fungusite dirençli patojen ırklarının ortaya çıkması gibi önemli riskleri de beraberinde getirmektedir. Bilinen standart dayanıklı çeşitlerin kullanımında ise patojen ırklarının, çeşitli etmenlerle sık sık mutasyona uğrayarak yeni virülens özelliğe sahip ırklar oluşturması ve bu ırkların ekilen dayanıklı buğday çeşitlerinde hastalık geliştirmesi önemli bir sorundur. Yeni oluşan patojen ırkları bazı yıllarda önemli verim kayıplarının yaşandığı ciddi epidemiler oluşturmuştur ve bu olasılık her dönem geçerliliğini korumaktadır. Dolayısıyla tüm dünyada kabul gören en etkin ve çevreci yöntem bilinen patojen ırklarına dayanıklı yeni buğday çeşitlerinin geliştirilmesidir. Ancak buğday gibi poliploidi gösteren karmaşık yapılı



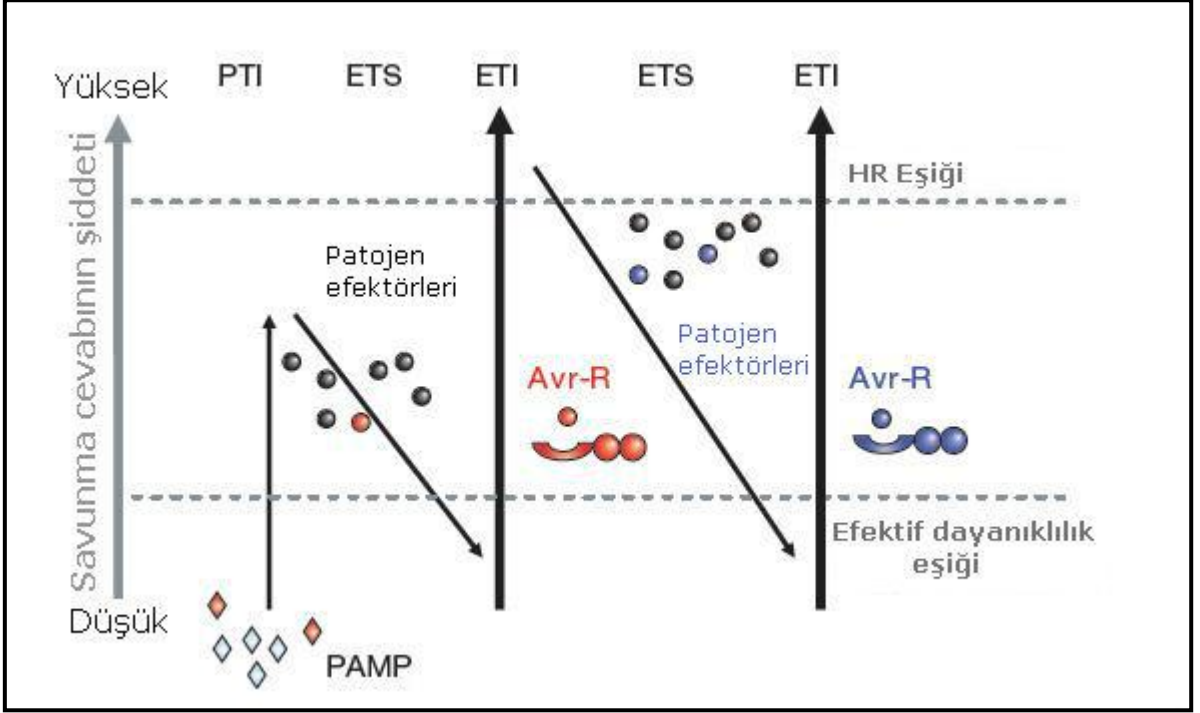
genoma sahip bitkilerde klasik ıslah çalışmaları ile yeni çeşit geliştirilmesi hem yoğun emek gerektiren, hem pahalı hem de çok uzun zaman alan (yaklaşık 13-15 yıl) bir yöntemdir. Oysa bitkideki bu uzun sürece karşın patojenin birkaç yıl arayla yeni virülens özelliğe sahip yeni ırklar geliştirebildiği göz önüne alındığında daha etkin ve hızlı stratejilere ihtiyaç duyulduğu açıktır. Yeni stratejilerin geliştirilmesinde, özellikle bitkide direnç ve hassasiyet cevabını yöneten moleküler mekanizmanın aydınlatılmasının önemi tüm dünyada kabul görmekte ve yoğun çaba harcanmaktadır. Bu alandaki moleküler çalışmaların önemli bir kısmı dayanıklılıktan sorumlu genlerin özellikle de sarı pas dayanıklılık (*Yr*) genlerinin belirlenmesi, tanımlanması ve klonlanmasına yönelik genetik çalışmaları, diğer önemli kısmı ise dayanıklılık ve hassasiyet cevabının gelişimde rol alan biyomoleküllerin tanımlanması, işlev ve etkileşimlerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmaları kapsar. Günümüzde yoğun olarak yürütülen genomik çalışmalar sonucunda 70 tane *Yr* geni belirlenmiş ve birçok gen adayı da kısmen karakterize edilmiştir. Bununla birlikte sadece üç *Yr* geni (*Yr10*, *Ur18/Lr34*, *Yr36*) klonlanabilmiştir. Her bir *Yr* gen ürünü belli bir patojen efektör gen (*Avr*) rnne spesifiktir. Bu nedenle *Yr* genlerinin sorumlu olduğu dayanıklılık cevabı uygun *Avr* geni taşıyan belli patojen ırklarına özgüdür, dolayısıyla bitki farklı *Avr* geni taşıyan patojenlerle karşılaştığında dayanıklılık cevabı gelişmez (Chen, 2005; McIntosh ve diğ, 2008; Li ve diğ, 2011).

### **2.3.2. Sarı Pas Dayanıklılığının Moleküler Mekanizması**

Bitki patojenle karşılaştığında patojenin dokulara girişini ve gelişmesini engelleyecek savunma mekanizmaları ve yapıları geliştirir. Kütikula ile kaplanmış hücre duvarları bitkinin ilk savunma hattını oluşturur ve patojenin bitkiye girişini sınırlar. Sarı pas gibi biyotrofik patojenlerde, patojenin yaşamını sürdürüp çoğalabilmesi için mutlaka bitki hücreleri içine giriş yapması ve hücre içeriğini kullanması gerekmektedir. Bu nedenle patojenin ilk hedefi yaprak yüzeyine tutunarak doğrudan stomalar, yaralar gibi doğal boşluklardan ya da hidrolitik enzimler ve/veya enfektif yapılar olan appresoryumlar aracılığıyla dolaylı olarak bitki hücresine giriş yapmaktır (Lazniewska ve diğ, 2010). Patojen saldırısına karşılık bitkide savunma cevabının oluşabilmesi için öncelikle patojenin bitki tarafından tanınması ve bu tanıma ile savunmada rol alan genlerin ve moleküllerin aktifleştirilmesi gerekir. Tanıma ile sentezlenen/aktifleştirilen proteinler/moleküller

aracılığıyla geliştirilen bir dizi reaksiyonla patojenin bitkide gelişimi ve etkisi durdurulmaya çalışılır (Kitajima ve Sato, 1999; Selitrennikoff, 2001).

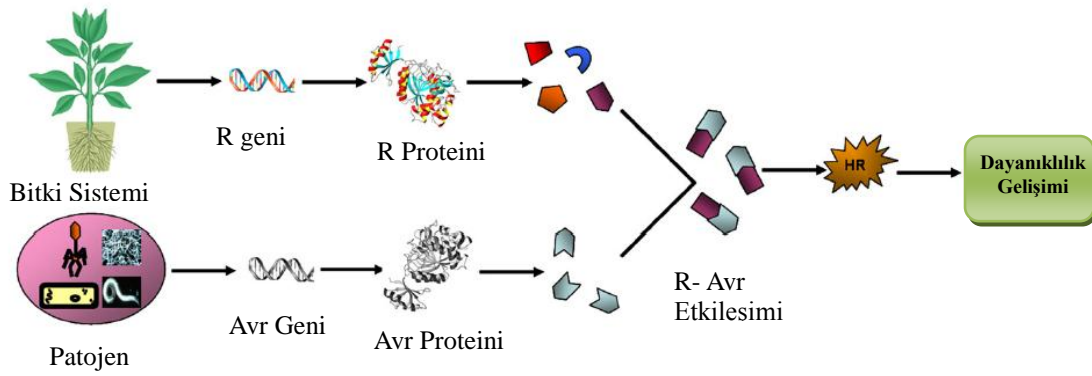
Patojenin bitki tarafından nasıl tanındığı tüm ayrıntılarıyla bilinmemekle birlikte iki şekilde gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Öncelikle elisitör özelliği gösteren lipopolisakkaritler, kitinler, glukanlar ve flagellinler gibi patojenle ilişkili moleküler motifler (MAMPs “Microbe Associated Molecular Patterns veya PAMP- “Pathogen Associated Molecular Patterns”)’in bitki yüzeyindeki reseptörlerce tanınması ile gerçekleştirilir (Gururani ve diğ., 2012). Bu yapılar oldukça iyi korunmuştur ve bitki tarafından tanındığında bitkide bazal savunma sistemi harekete geçirilir. Bu şekilde oluşan immüniteye patojenle-tetiklenmiş immünite (PTI)’de denmektedir. Bitkinin PAMP moleküllerini tanımasını sağlayan reseptörleri “Motif Tanıma Reseptörleri” (Pattern Recognition Receptors PRRs) olarak adlandırılır. Örneğin flg2 flagellin molekülü bitki hücre membranında bulunan FLS2 olarak bilinen PRR tarafından tanınır. MAMP’ların PRR’lar tarafından algılanması zayıf bir immünite sağlamakla beraber patojenin ileri kolonizasyonunu durdurur (Jones ve Dangl, 2006; Bent ve diğ., 2007). Patojen tarafından, bitkideki bu savunma cevabının engellenmesine yönelik *Avr* (avirülens) genleri tarafından kodlanan efektör proteinleri sentezlenir. Bitkide ise patojenin efektör proteinlerini tanıyarak daha güçlü bir savunma cevabının gelişmesine yol açan ve dayanıklılık genlerince kodlanan R proteinleri bulunur. Sarı pas enfeksiyonunda, patojen ırkları,ırka özgü *Avr* genini, dayanıklı buğday çeşitleri ise bu *Avr*’lere spesifik *Yr* genlerini taşımaktadır. Belli bir sarı pas ırkı ile o ırka dayanıklı buğday çeşidi karşılaştığında, patojenin efektör proteini ile bitkinin R proteini “reseptör-ligand” biçiminde etkileşerek patojenin bitki tarafından tanınmasını sağlar ve daha güçlü bir savunma cevabı gelişir (Şekil 2.5). Bu tanıma ve ardından gelişen dayanıklılık cevabı, **gene-karşı-gen** modeli olarak da ifade edilmektedir ve ırka özgüdür. Bir başka deyişle belli patojen ırkları ancak o ırka özgün R geni taşıyan bitkilerce tanınabilmekte ve ancak bu koşulda bitkinin savunma sistemi aktifleştirilebilmektedir. Aksi taktirde bitki patojeni tanıyamamakta ve hastalık gelişmektedir (Eckardt, 2006).



Şekil 2.5. Bitki ve patojen arasındaki etkileşimi ve ardından gelişen savunma cevabını gösteren zigzag modeli (Jones ve Dangl, 2006).

(PTI: Patojenle Tetiklenmiş İmmünite, PAMP: Patojen İlişkili Moleküler Motifler, ETS: Efektörle Tetiklenmiş Hassasiyet - Effector Triggered Susceptibility; ETI: Efektörle Tetiklenmiş Bağışıklık - Effector Triggered Immunity)

İrka özgü dayanıklılıkta, bitkide patojenin Avr proteinine (efektör) özgü R proteini yoksa ve patojen bitkiyi enfekte ederek hayatını sürdürebiliyorsa bu durum **uyumlu ilişki** olarak adlandırılır; bitki **hassas**, patojen de **virulent** olarak tanımlanır. Eğer patojen bitki üzerinde çoğalabiliyor ve bitkide hastalık meydana getirmeksizin kendi yaşam döngüsünü sürdürebiliyorsa bitki için o patojene **tolerant** denir. Bitki, patojenin Avr proteinine özgü R proteini içeriyor ve bu yolla savunma sistemini aktive ederek patojen enfeksiyonunu engelleyebiliyorsa, bitki o patojene karşı **dayanıklı** olarak kabul edilir, patojen ise **avirulent** olarak adlandırılır. Patojen ve bitki arasındaki bu ilişki de **uyumsuz ilişki** olarak tanımlanır (Tör, 1998; Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Bitki patojen etkileşiminde uyumsuz ilişki sonucu dayanıklılık cevabının gelişimi (Gururani ve diğ., 2012).

Patojenin bitki tarafından tanınmasının ardından patojenin biyotrofik, nekrotrofik ya da böcek olmasına göre, bitkilerde birbirine benzeyen farklı savunma mekanizmaları gelişir. Sarı pas gibi biyotrofik patojenlerle savaş, genellikle endojen fitohormonlardan biri olan salisilik asitin (SA) büyük rol oynadığı bir sinyal iletimi ile tetiklenir (Dong, 1998) ve böylece “Yüksek Duyarlılık Cevabı” (Hyper Sensitive Response-HR) adı verilen bölgesel hücre ölümleri gerçekleşir ya da SA-bağımlı sinyal yolağı aktive edilir. SA seviyesi artar ve bununla beraber PR-1’i (Patojeniz İlişkili-1) de içine alan birçok savunma ilişkili gen aktive edilir. SA sinyal yolağı birçok geri besleme döngüsü içerdiğinden oluşan reaksiyonların sıralanması zordur. Hücre ölümü SA üretimini teşvik eder bununla beraber SA üretimi de hücre ölümünü teşvik edicidir. Nekrotrofik patojen ve herbivor böceklere karşı savunma ise jasmonik asit (JA) ve etilen ile aktive edilir (Howe, 2004; Koornneef ve Pieterse, 2008; Leon-Reyes ve diğ., 2009; Reymond ve Farmer, 1998; Spoel ve Dong, 2008).

Tetiklenen savunma cevabı, R geni aracılı dayanıklılık ile SA üretimi ve SA-denetimli savunma genlerinin ekspresyonunu da içine alan karma bir sistemdir (Tsuda ve diğ., 2008). Genellikle hücre zarındaki iyon akışında değişim, ekstraselüler oksidatif patlama, enfeksiyon bölgesi ve etrafında programlı hücre ölümü, bölgesel ve sistemik transkripsiyonel regülasyon ile karakterize edilir. Bütün bu olayların ortak hedefi, patojenin öldürülmesi veya gelişiminin durdurulması böylece hastalık oluşmasının önlenmesidir (Belkhadir ve diğ., 2004).

### 2.3.2.1 Hücre Duvarının Güçlendirilmesi

Patojenin hücre duvarına tutunmasından sonra görülen ilk cevap, sitoplazmik içeriğin tutunma bölgesinde sitoplazma birikimi ile güçlendirilmesidir. Bu sitoplazmik agregatların, hücre duvarını güçlendirmek için gerekli maddelerin sentezinde kullanılan bileşenler olduğu düşünülmektedir. Birçok patojen germ tüpleri, hif ya da haustoryaları ile hücreye bir bölgeden tutunmak zorundadır. Eğer hücre bu tutunma bölgesini onarmakta ya da güçlendirmekte hızlı olabilirse patojenin tutunma verimi düşürülür ve patojen gelişimi yavaşlatılır.

Hidroksiprolince zengin glikoproteinler, bitki hücre duvarı içinde bulunan ve sekonder hücre duvarı kalınlaştırmasında görev alan yapısal proteinlerdir. Patojen saldırısını takiben bitkide, hücre duvarını daha sert yapmak için bu proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonu aktive edilir. Hemen ardından oksidatif patlama ve hidrojen peroksit salınımı ile hidroksiprolince zengin bu proteinler ve diğer hücre duvarı bileşenleri bir araya gelerek çapraz bağlar oluşturur ve böylece hücre duvarı patojen tarafından sindirime karşı güçlendirilir (Hammond-Kosack ve Jones, 1996).

Çapraz bağlanan hidroksiprolince zengin glikoproteinler, bitki hücre duvarında lignin birikimine de yol açar. Enfeksiyon sonrası lignin ve suberin bu hızlı birikimi, tahılları da içine alan birçok bitkide, patojen olmayan uyarıcılara ve avirüent patojenlere karşı dayanıklılıkta rol oynar. Patojende hif gelişiminden önce lignin depolanması bitkiyi fungal penetrasyona karşı dayanıklı kılar. Lignin, ayrıca hif uçlarına bağlandığı bakteri hücrelerinin büyümesini ve hareketini engelleyip patojen enzimlerinin ve toksinlerinin hücreye girişini ve patojenin su ve besin almasını engeller. Ayrıca lignin biyosentezi sırasında üretilen öncül moleküller ve serbest radikaller patojen için toksiktir. Ligninin etkisi, savunma cevabı süresince salınan reaktif oksijen türleri ve fenolik bileşenlerden türetilen daha toksik polimerler ve kinonlar tarafından artırılabilir. Hücre duvarı güçlendirilmesi, savunma sistemi için önemli bir bileşendir ve dayanıklı konukçularda hassaslara göre daha fazla, daha hızlı ve daha yoğundur. Hücre duvarının güçlendirilmesi, dayanıklılığa ve hücre onarımına yardımcı olur, ancak her zaman enfeksiyonun önlenmesi için yeterli olmayabilir.

### 2.3.2.2 İyon Akışında Değişimler

Bitkilerin dayanıklılık cevabı sırasında hücrelerde bazı iyonların miktarında artış görülmektedir. Özellikle  $Ca^{+2}$  birikimi sonucunda sinyal yollarıyla ilişkili olarak  $H^+/K^+$  geçişlerinde artış gözlenir. Bitki-patojen etkileşimleri sırasında hücre içi  $Ca^{+2}$  taşınımı bölgesel ve sistemik kazanılmış dayanıklılık için erken cevapta gerekli bir olaydır.  $Ca^{+2}$ 'un besin ve yapısal güçlendirme için anahtar iyon rolünü üstlendiği uzun bir süredir bilinmektedir (Hepler, 2005). Hücre duvarı ve organellerdeki  $Ca^{+2}$  milimolar seviyede iken sitoplazmik  $Ca^{+2}$  ( $[Ca^{+2}]_{cyt}$ ) nanomolar (100 – 200 nM) düzeyindedir (Trewavas ve Malho, 1998; Knight, 2000; Reddy, 2004). Hücre içinde yüksek  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu, hücredeki negatif yüklü molekülleri şelatlayabilir ve bu da sitotoksositeye neden olabilir. Bu nedenle sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun düşük seviyede tutulması gerekmektedir ve bunun için hücre, sitoplazmik  $Ca^{+2}$ 'u apoplasta ya da organellere pompalar. Sitozol ve diğer hücresel bileşenlerdeki serbest  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun incelendiği çalışmalarda, birçok abiyotik stres türünün (soğuk, sıcak, tuz, kuraklık, ozmotik stres, temas ve rüzgar gibi mekanik uyarıcılar, oksidatif stres, ozon ve hipoksi gibi) hücresel  $Ca^{+2}$ , özellikle de sitoplazmik  $Ca^{+2}$  miktarını hızlıca artırdığı, bazı durumlarda da nükleustaki ve organellerdeki  $Ca^{+2}$ 'un miktarında artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca biyotik stres etmenlerinin de (patojen, savunma elisitörleri ve böcek saldırısı) hücresel  $Ca^{+2}$  seviyesinde değişime yol açtığı bilinmektedir. Hücresel  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki bu bölgesel ve geçici değişimler bir uyarana karşı verilen özelleşmiş fizyolojik sinyalleri ortaya çıkarmaktadır (Reddy, 2001; Hepler, 2005; McAinsh ve Pittman, 2009; DeFalco ve diğ., 2010).

Kalsiyum akışları, “Yüksek Duyarlılık Cevabı” (Hypersensitive Response-HR) adı verilen programlanmış hücre ölümünde de büyük öneme sahiptir (Greenberg, 1997). Tütün süspansiyon hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, SA uygulaması sonrası hücrelerde hemen ve kısa süreli olarak süperoksit ( $O_2^-$ ) radikallerinde artış; ardından da sitozolik  $Ca^{+2}$  düzeyinde artış olduğu belirlenmiştir (Kawano ve diğ., 1998). Ayrıca  $Ca^{+2}$  akışları patojen ile enfekte tütün, börülce ve soya süspansiyon hücrelerinde de HR aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Atkinson ve diğ., 1990; Xu ve Heath, 1998; Levine ve diğ., 1996). Yapılan bir başka çalışmada ise  $Ca^{+2}$ 'un SA-denetimli yolak üzerinden savunma genlerinin aktivasyonu ile da ilişkili olduğu ileri

sürülmüştür (Dempsey, 1999).

### 2.3.2.3 Oksidatif Patlama

Genel olarak bitkilerde patojen dayanıklılık cevabında ilk savunma yanıtı olarak dikkat çeken oksidatif patlama, hızlı biçimde ve yüksek miktarlarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ifade etmektedir (Robatzek ve Saijo, 2008). Görülen tipik ROS örnekleri süperoksit ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'tir. Moleküler oksijenden süperoksit oluşumu, plazma membranı ilişkili NADPH oksidaz aracılığıyla ve memeli savunma yanıtında rol alan nötrofillerdeki sisteme benzer bir biçimde gerçekleşmektedir. Bitki dışındaki süperoksit anyonları genellikle hızlı bir biçimde plazma membranından geçebilecek özellikte olan  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülür.  $H_2O_2$  hücrelerde katalaz, askorbat peroksidaz ya da glutatyon peroksidaz enzimleri ile suya dönüştürülerek zararsız hale getirilir.

ROS'ların bitki savunma sisteminde birkaç rolü belirlenmiştir. Birincil olarak ROS'lar doğrudan patojen için toksik etki gösterebilmektedir. Yapılan çalışmalarda hücrelere  $H_2O_2$  eklenmesinin fungal patojenlerde spor gelişimini inhibe ettiği ortaya konulmuştur. Bu çalışmalar sonucunda oksidatif patlamanın savunma mekanizmasındaki en önemli etkilerinin patojenin ölümüne yol açmak veya gelişimini engelleyerek yayılımını durdurmak olduğu belirlenmiştir (Peng ve Kuc, 1992).

ROS'ların, bitkide patojene karşı verilen diğer savunma cevabı olan membran kalınlaşmasında ve buna bağlı olarak bazı maddelerin birikiminde de rolleri vardır.  $H_2O_2$  etkisi ile, patojenin bitki hücre duvarına tutunmasına ve duvarın patojen kaynaklı enzimler ile parçalanmasına karşı dayanıklı kılmak üzere, çeşitli modifikasyonlar olmaktadır. Bitki hücre duvarı iki farklı yoldan güçlendirilmektedir. 1) Oksidatif patlama ve  $H_2O_2$  salınımı sonucunda hidrokisprolin bakımından zengin proteinler ve diğer hücre duvarı bileşenleri arasında çapraz bağların kurulması ile; 2) Peroksidaz enziminin katalizörlüğünde lignin polimerizasyonunun artırılması ile. Burada amaç bitkinin ilk transkripsiyonel savunma cevabı oluşana kadar patojeni yavaşlatmak ve HR sonucu ölen bitki hücrelerinde hapsedmektir. Oksidatif

patlamanın savunma mekanizmasındaki bir başka görevi, savunma sinyal yollarında rol alarak bir takım genlerin ekspresyonunu aktive etmektir.  $H_2O_2$ , SA biyosentezi için gerekli olan benzoik asit 2-hidroksilaz (BA 2-H) enzim aktivitesini indükler. Ayrıca  $H_2O_2$ 'in glutasyon S-transferaz (GST) gibi belirli hücre koruma mekanizmalarında görev alan enzim ve proteinleri kodlayan genleri indüklediği bilinmektedir. Ayrıca ROS'ların hızlı biçimde ve yüksek miktarda üretimi savunma yanıtı veren hücrelerdeki redoks dengesini önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Redoksla-düzenlenen memeli transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi, spesifik bitki transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi de hücrelerin redoks durumunun değişimiyle düzenlenmektedir. Örneğin, fungal elisitöre karşı savunma cevabı oluşumu için soya hücrelerine dış kaynaklı  $H_2O_2$  eklenmesi ile fenil alanin amonyak liyaz (PAL) ve kalkon sentaz (chalcone sentaz, CHS) transkriptlerinde düşük seviyeli birikim gözlenirken, GST, glutasyon peroksidaz ve poliubikitin mRNA miktarlarında hızlı artışlar belirlenmiştir. Bunların dışında, oksidatif patlamanın SA ve SAR oluşumu ile ilişkisi incelendiğinde, SA'nın  $H_2O_2$  miktarında artışa yol açtığı ve katalaz oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyon da SAR için sinyal görevi gören  $H_2O_2$  birikimine neden olmaktadır (Lamb ve Dixon, 1997).

#### 2.3.2.4 Transkripsiyonel Yeniden Programlama (Savunma Genlerinin Aktivasyonu)

Bitkide, patojenle etkileşim sonrası dayanıklılık cevabının belirteci olarak kabul edilen bir takım genlerin aktifleşerek eksprese edildiği görülmektedir. Bu genler, JA ile ilişkili olarak "Vejetatif Depolama Protein 1" (VSP1); SA ile ilişkili olarak "Glutaredoksin 480" (GRX480); etilen ilişkili olarak "Patojenez-İlişkili-3/Kitinaz B" (PR-3/ChiB) ve "Patojenez-İlişkili-4/Hevein Benzeri" (PR-4/HEL) gibi proteinleri kodlamaktadır. JA ve etilen etkisiyle "Bitki Defensin 1.2" (PDF1.2) ya da etilen ve SA'nın etkisiyle aktive edilen genlerin ürünlerine örnek olarak ise "PR-1" ve "Glutasyon-S-Transferaz 1" (GST1) verilebilir. Bu bilgiler, uygun transkripsiyon faktörlerinin bazı sinyal yolları sonucunda üretilmesine ya da aktif hale getirilmesine ihtiyaç duyulduğunu kanıtlamaktadır (Verk ve diğ., 2009).

Bitkiler patojen saldırılarının ardından bir yandan bölgesel savunma cevabı oluştururken bir yandan da patojenle inoküle olmamış bölgelerde bazı PR proteinlerinin sentezinden sorumlu savunma genlerini aktif hale getirerek bu



bölgelerde sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) adı verilen ve farklı patojenlere karşı uzun süreli direnç sağlayan bir savunma cevabını başlatır (Lazniewska, 2010; Dempsey, 1999; Wang ve diğ., 2010). Yapılan çalışmalarda patojen enfeksiyonu sonrasında bitkide hem enfeksiyon bölgesinde hem de uzak bölgelerde SA seviyesinde artış gözlenmiştir (Zhang ve diğ., 2010). Biyotrofik patojenlere karşı dayanıklılıkta, SA etkisiyle enfeksiyondan hemen sonra PR proteinlerinin sentezi başlatılır. SA'nın miktarının artmasının PR genlerinin indüklenmesiyle ilişkili olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Loake ve Grant, 2007). SAR oluşumundaki rolleri tam olarak belirlenememiş olsa da, PR genleri/proteinleri SAR cevabının belirlenmesinde önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Patojen enfeksiyonu sonrası daha az miktarda SA salınımı yapan transgenik tütün ve *Arabidopsis*'te yapılan çalışmalarda bu bitkilerin PR genlerini aktifleştiremediği ve bu nedenle de zayıf SAR cevabı oluşturduğu düşünülmektedir (Durrant ve Dong, 2004).

Bir kısmı antifungal özellik gösteren PR proteinlerin sentezi patojenle karşılaşmanın hemen ardından indüklenir. Bu proteinler, serolojik ve amino asit dizi analizine göre 17 protein ailesinde toplanır (van Loon ve diğ., 2006). Patojen bitkiyi enfekte ettiğinde, PR-1 proteinleri yüksek düzeyde birikir. PR-1'in hem bitkide hem de *in vitro*'da antifungal özellik gösterdiği bulunmuştur (Niderman ve diğ., 1995). PR-2 proteinleri *in vitro*'da (1,3)- $\beta$ -endoglukanaz aktivitesine sahiptir. PR-2 proteini mantar hücre duvarındaki yapısal (1,3)- $\beta$ -glukanı hidroliz ederek hücre duvarının zayıflamasına yol açar. Bu zayıflamış hücre duvarı hücrenin lizisine ve ölümüne neden olur. PR-3 proteinleri *in vitro* kitinaz aktivitesine sahiptir. PR-3 proteinleri *in situ* hücre duvarındaki kitin polimerlerini zedeleyen endokitinazlardır. Bu durum patojen hücre duvarının özelliğini kaybederek güçsüzleşmesine ve patojen hücrelerin osmotik olarak daha hassas hale gelmelerine neden olur. PR-4'ler kitin bağlayıcı proteinlerdir. PR-5 proteinleri taumatinin amino asit dizisi ile önemli benzerlik gösterir ve Taumatin-benzeri (TL) proteinler olarak bilinir. Birçok TL proteini fungus hücrelerinin hücre duvarını etkileyerek hücre geçirgenliğinde değişikliklere yol açar (Selitrennikoff, 2001). Siklofilinler hücre içi siklosporin reseptörü olarak iş gören yüksek korunmuş proteinlerdir. *In vitro*'da  $\alpha$  ve  $\beta$ -glukozidazı baskılarlar (Barbieri ve diğ., 1993).

### 2.3.2.5 Programlı Hücre Ölümü

Hipersensitif cevap (HR), bitkiyi işgal eden patojeni besin kaynağından mahrum ederek gelişim ve yayılımını durdurma temeline dayanan, programlı hücre ölümüne yol açan, genetik faktörler tarafından aktive edilen, doğal bağışıklık ile kazanılmış bir savunma cevabıdır. HR genellikle nekrotik lezyonlar şeklinde gözlenir. Hipersensitiflik terimi konukçu bitki hücrelerinin patojen saldırısına karşı yüksek duyarlılık göstermesini ifade etmektedir. Patojen saldırısını takiben konukçu hücreler patojenin yayılımını engellemek için intihar mekanizması başlatırlar. Genel olarak HR, oksidatif patlama ve bunu takiben sitoplazmik içeriğin akışında artış, sitoplazmada granülleşme ve ardından sitoplazma içeriğinde çökelmelerin oluşumu, membran bozulması ile birlikte zardan ayrılan hücresel bileşen ve organellerin hücre içine dağılması ile karakterize edilir (Marsalis ve Natalie, 2006) HR oluşumundan hemen önce ya da eş zamanlı olarak patojenle inoküle olan yaprakta hidrolitik enzimler, proteinaz inhibitörleri ve bazı PR proteinleri sentezlenir. Patojenin nekrotrofik veya biyotrofik olduğu birçok konukçu-patojen etkileşiminde, HR olarak tanımlanan hızlı hücresel intihar olayı tüm savunma cevabına yardımcı olarak patojen gelişimini sınırlar veya ölümüne yardımcı olarak savunmada önemli rol oynar. Fakat bazı etkileşimlerde bitki savunması HR'den bağımsızdır. HR ile gerçekleştirilen dayanıklılık mekanizması konukçu-parazit etkileşimlerinde patojenin besinsel gereksinimlerine, zamanlamasına, yerine ve konukçu tarafından gösterilen yanıtın şiddetine dayalıdır.

## 2.4 SARI PAS ARAŞTIRMALARINDA MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR

### 2.4.1 Genomik Yaklaşım

Sarı pas hastalığına direnç mekanizması, 20. yüzyılın başından beri artan bir ilgiyle araştırılmaktadır. İlk olarak Biffen 1905 yılında, Mendel yasalarını takip ederek buğdayda sarı pas direncini göstermiştir (Hovmoller ve diğ., 2011). Günümüzde kesinleşmiş (*Yr* harflerinin sonuna numara eklenerek belirtilen) ve kesinleşmemiş (*Yr* harflerinin sonuna harf eklenerek belirtilen) toplam 70 sarı pas dayanıklılık geni belirlenmiştir (Chen, 2005). Belirlenen 70 genin birçoğu farklı buğday genotiplerinde çeşitli patojen ırklarına karşı spesifik olan ve farklı kromozomal bölgelerde bulunan genlerdir (Chen, 2002). Bilinen genlerin birçoğu bitkinin tüm gelişim evrelerinde

dayanıklılık sağlamaktadır. Genomik çalışmaların önemli bir kısmı sarı pas dayanıklılık genlerinin haritalanması için moleküler belirteçlerin (markör) geliştirilmesi ve belirteç-destekli seçim (“Marker Assisted Selection” - MAS) ile yeni çeşit geliştirmek üzere, dayanıklılık lokuslarıyla bağlantılı belirteçlerin belirlenmesine yöneliktir. Birçok *Yr* geni için moleküler belirteçler tanımlanmıştır. Bunlar arasında en iyi bilinenleri *Yr5*, *Yr9*, *Yr10*, *Yr15*, *Yr17*, *Yr18*, *Yr24*, *Yr26*, *Yr28*, *Yr32*, *Yr33*, *Yr34*, *Yr36*, *YrH52*, ve *Yrns-B1*’dir (Chen, 2005). Bulunan belirteçin gen bölgesine olan yakınlığı o belirtecin MAS için kullanılabilirliğini artırmaktadır. Bu belirteçlerin belirlenmesinde “Rasgele Artırılmış Polimorfik DNA” (RAPD), “Kısa Dizi Tekrarları” (SSR), “Eksprese Edilmiş Sekans Etiketli-Kısa Dizi Tekrarları” (EST-SSR), “Dayanıklılık Gen Analog Polimorfizmi” (RGAP) ve “Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi” (AFLP) gibi moleküler teknikler kullanılmaktadır (Seah ve diğ., 2001; Chen, 2005).

Sarı pas hastalığına dayanıklılıkla ilişkili bir göstergenin ve bazı yerel çeşitler arasındaki genetik çeşitliliğin araştırıldığı çalışmada, buğday EST (eksprese edilmiş sekans) veri tabanından yararlanılarak elde edilen kontig ve singletonların yanı sıra RGA (dayanıklılık gen analogları)-EST’ler çalışılan 3 dayanıklı ve 3 hassas buğday çeşidinde taranmıştır (Karakaş, 2010).

#### **2.4.2 Transkriptomik Yaklaşım**

Buğdayın taşıdığı büyük ve karışık genom, transformasyon zorlukları, kültüre edilmesinin güçlüğü gibi nedenlerden dolayı buğday-pas mantarı etkileşimini yöneten genlerin tanımlanmasında moleküler ve genetik tekniklerin çoğunun kullanımı kısıtlıdır. Literatürde daha çok gen ekspresyon analizi odaklı çalışmalar bulunmaktadır (Wang ve diğ., 2010). Mikrodizin analizi, komplementer DNA (cDNA) AFLP tekniği ve çip teknolojisi gibi yeni teknolojilerin kullanıldığı araştırmalara rastlanmaktadır (Wang ve diğ., 2010; Coram ve diğ., 2008). Bu çalışmalar sonucunda, sarı pas enfeksiyonuna karşı savunma mekanizmasında rol aldığı tespit edilen birçok mRNA ürünü ortaya konulmuştur. Bu ürünler sayesinde dayanıklı çeşitlerin patojene karşı ırka özgü ve ırka özgü olmayan olmak üzere karmaşık savunma sistemleri geliştirdiği, bu yolla patojen atağını algıladığı,

sınırlandırdığı ve karşı atağa geçebildiğini gösteren bulgular elde edilmiştir. Bu bulgular dayanıklılıkla ilişkili pek çok gen hakkında mRNA düzeyinde bilgiler ortaya koymuştur. Örneğin, SGT1'in, mekanizması henüz anlaşılamamış olmakla beraber, dayanıklılıkta önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Azevedo ve diğ., 2002). RAR1, SGT1 ve Hsp90 ile birlikte oluşturulan şaperon kompleksi, dayanıklılık sinyali için gerekli substrat stabilitesi veya aktivitesini düzenler (Parmil ve diğ., 2004). Bunun yanı sıra MAP kinazlar (mitojen aktiveleştirici protein kinazlar); erken bitki savunma sinyali için gereklidirler. Bu enzimler savunma sırasında transkripsiyonel düzenlenmeye yardımcı olurlar, patojenez ile ilişkili PR proteinlerinin anlatımını teşvik ederler ve patojene karşı dirençliliği artırır (Zhang ve Klessig, 1997; Doehlemann ve diğ., 2006). SIP kinaz (salisilat duyarlı MAP kinaz), WIP kinaz (hücre duvarına duyarlı MAP kinaz) gibi bitki savunmasında görevli MAP kinazlar da mevcuttur. Ubikitin tüm hücrelerde bulunan 76 amino asitlik bir proteindir (Dreher ve Callis, 2007). Ubikitinasyon hücre çevriminin düzenlenmesi, sinyal iletimi, programlı hücre ölümü ve DNA onarımı gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinden, ayrıca R geninden kaynaklanan hastalık dirençliliğinden de sorumludur. Bu savunma sisteminde ubikitinasyonun rolü, sinyal proteinlerinin modifikasyonu, transkripsiyon, protein trafiği, membran geçirgenliği ve protein kinazların aktiveleştirilmesi gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesi şeklindedir. Bu görevlerden sorumlu ubikitinasyon enzimleri 'ubikitin aktiveleştirici enzim (E1), ubikitin konjuge edici enzim (E2) ve ubikitin ligasyon enzimi (E3)'dir (Yamamoto ve diğ., 2004).

Gen ekspresyonu çalışmaları kapsamında ülkemizde yapılan bir başka çalışmada ise, tez bitki materyali İzgi2001'i de içine alan yerel bazı kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinde, bitkilerde mantar hastalıklarına karşı dayanıklılık mekanizmasında rol oynayan bazı genlerin karşılaştırmalı gen ekspresyon analizleri yapılmıştır. Bu analizlerde PR-1 PR-4, PR-5, MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), RAD6 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme), Hsp70 (Heat shock protein 70), Hsp90 (Heat shock protein 90), SGT1 (Suppressor of G<sub>2</sub> allele of *skp1*), RAR1 (Required for *Mla12* Resistance) ve RLK (Receptor Like Kinase) genleri kullanılmıştır. Ayrıca buğday EST veribankasında stresle ilişkili genler ile, belirlenen EST dizilerinden yola çıkılarak elde edilen kontig ve singletonların ekspresyon analizleri

karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve bu yolla sarı pas dayanıklılığında rol alan genler belirlenmeye çalışılmıştır (Karakaş, 2010).

### 2.4.3 Proteomik Yaklaşım

Genomik ve transkriptomik tekniklerle enfeksiyon sürecinde anlatımı yapılan birçok gen belirlenmiş olsa da, bu genlerin görevleri henüz tam olarak anlaşılammıştır. (Ma ve diğ., 2009; Wang ve diğ., 2009). Post transkripsiyonal regülasyonların ve protein kararlılıklarının farklı olması nedeniyle transkriptom verileriyle protein düzeyindeki bilgiler tam olarak örtüşmez (Jansen ve diğ., 2002). Bitki-patojenez ilişkisi gibi son derece karmaşık mekanizmaların aydınlatılmasında proteomik analizler daha somut veriler ortaya koymaktadır.

Son yıllarda bitki patojen ilişkilerini içeren çalışmalar sürekli artış göstermektedir (Yoki ve Samuel, 2007). Bununla birlikte sarı pas dayanıklılığına ilişkin buğdayda yapılan sadece birkaç proteomik çalışma bulunmaktadır. Bitki dayanıklılığı ile ilişkili birçok çalışmada, patojen enfeksiyonundan önceki ve sonraki; ya da bitki patojen uyumu olduğu veya olmadığı durumlardaki protein anlatım düzeylerinin karşılaştırılması üzerinde durulmuştur. Farklı türlerde bulunan birçok proteinin birbirinin homoloğu olması sekans benzerliklerinden yola çıkılarak tanımlama yapma olanağı verir (Liska ve diğ., 2004). Fungal veya bakteriyel enfeksiyonlar sırasında artan proteinlerin çoğunun metabolizma, enerji üretimi ve savunma mekanizmalarında görev alan enzimler olduğu görülmektedir. Buğday ve *Fusarium graminearum* etkileşimi üzerine yapılan proteomik çalışmalarda; antioksidan özellik gösteren ve jasmonik asit sinyal yolağında, PR cevabı, aminoasit sentezi, karbon ve azot metabolizmasında ve stres cevabında görev alan proteinlerin anlatım düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2005; Zhou ve diğ., 2005, 2006; Li ve diğ., 2011).

Daha önce belirtildiği üzere buğday ve pas etmeni arasındaki ilişkinin çalışıldığı az sayıdaki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde Rampitsch ve diğ. (2006), kahverengi pas enfekte ve boş inokülasyon yapılmış duyarlı bir çeşit ile çalışmış, 2-boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ve kütle spektrometrik analizler (MS) ile

inokülasyondan 9 gün sonraki protein profillerini incelemişlerdir. Bu çalışmada bitkiye ait 7 ve daha önceden de belirlenmiş, fungusu ait 22 adet protein ve 3 tane daha önce belirlenmemiş, fakat fungal orijinli olduğu düşünülen protein saptanmıştır. (Rampitsch ve diğ., 2006).

Sarı pas etmeni buğday ilişkisini içeren çalışmalarda ise Ma ve diğ. (2009), tarafından yapılan bir çalışmada patojene dayanıklı buğday çeşidi Taichung29\*6/Yr5'in CYR32 sarı pas ırkı ile inoküle edilmiş ve boş inokülasyon yapılmış örneklerindeki protein profilleri karşılaştırılmıştır. Farklı anlatım yaptığı belirlenen 11 protein incelenmiş ve 1 homeodomain protein, 1 beta-glukozidaz ve 1 glutasyon transferaz proteinlerine rastlanmıştır (Ma ve diğ., 2009).

Literatürde sarı pas-buğday ilişkisi konusunda yapılan en güncel çalışma ise 2011 yılında Li ve diğ. (2011) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada virulent olan ve olmayan iki farklı Pst ırkı ile inoküle edilen buğdayda; inokülasyon sonrası 24. ve 72. saat örnekleri 2-DE ve MS analizi ile incelenmiştir. Hassas ve dirençli ırklar arasındaki protein miktar farklılıklarını belirlemek amaçlı yapılan bu çalışmada; farklı anlatım yaptığı belirlenen 23 protein tanımlanmıştır (Li ve diğ., 2011).

## **2.5 İKİ BOYUTLU SIVI KROMATOĞRAFİSİ (2D-LC)**

Total protein içeriğini oluşturan proteinlerin yüksek çözünürlükte tek tek ve tekrarlanabilir biçimde ayırımı proteomik çalışmaların en önemli aşamasıdır. Genel olarak bu aşamada iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ve iki boyutlu sıvı kromatografi (2D-LC) sistemleri kullanılmaktadır. 2D-PAGE daha yaygın kullanılan yöntem olmasına rağmen; uygulama zorluğu, fazla zaman gerektirmesi, duyarlılığının ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi önemli sorunlar içermektedir. Ayrıca kütle spektrometrisi ile alınan sonuçlar, 2D-PAGE yönteminin hidrofobik proteinlerin saptanmasında ve özdeş molekül ağırlığına sahip olan proteinlerin belirlenmesinde yetersiz kalabildiğini göstermektedir (Park, 2004). Ayrıca düşük anlatım düzeyine sahip proteinlerin belirlenmesinde de sorunlar yaşanmaktadır (Park, 2004; Agrawala ve diğ., 2005). Bu nedenle tez çalışmasında proteinlerin analizi 2D-PAGE'ye alternatif olarak geliştirilmiş iki boyutlu sıvı

kromatografi (2D-LC) sistemi olan ProteomeLab PF2D (protein fractionation 2 dimensional; Şekil 2.7) sistemi ile gerçekleştirilmiştir.



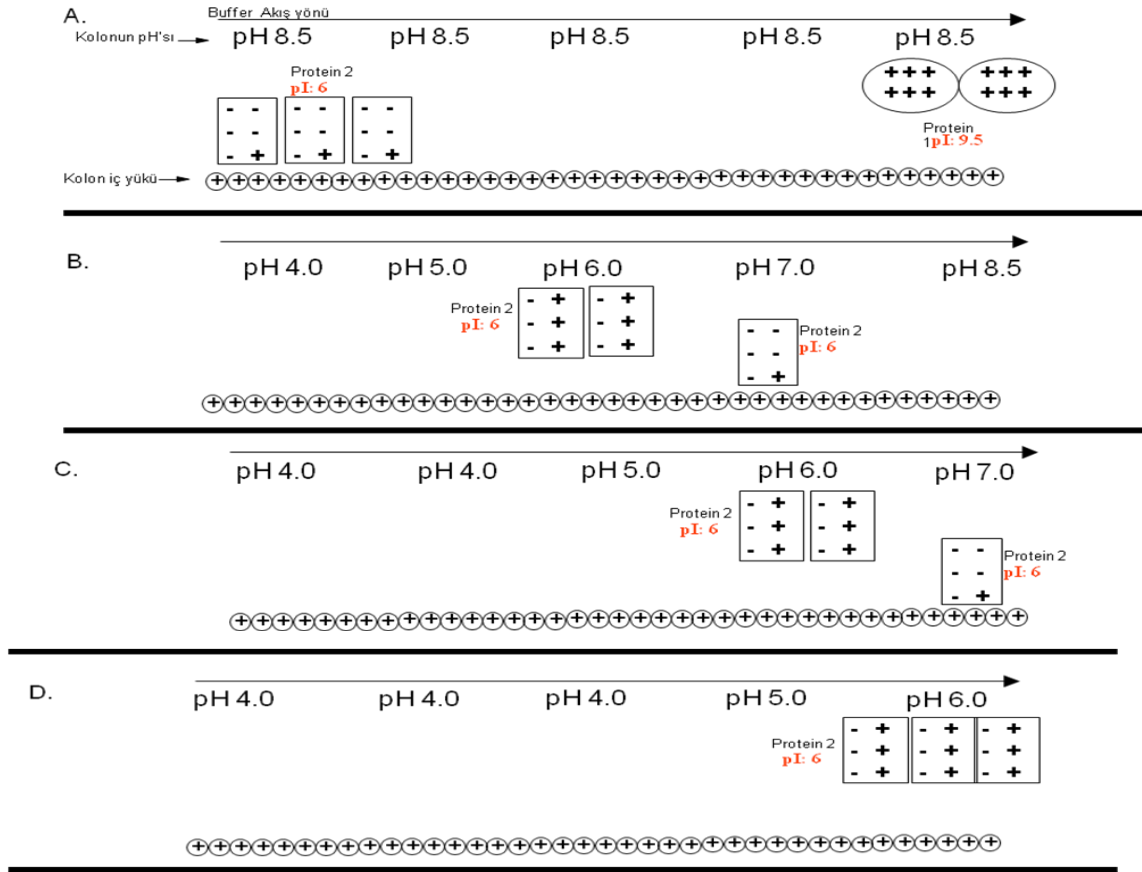
Şekil 2.7: Beckman Coulter PF2D Sistemi.

### 2.5.1 Birinci Boyutta Ayırım

PF2D sisteminde protein örnekleri, birinci boyutta “chromatofocusing“ (CF) kolonunda izoelektrik noktalarına (pI) göre ayrıştırılmakta ve ayrılan proteinler 96 kuyulu mikropalakalara fraksiyonlanmaktadır. Birinci boyutta izoelektrik noktasına göre ayırımın sağlanabilmesi için kolon içinde pH 8.5 ’dan başlayarak pH 4.0’a doğru giden bir pH gradiyenti oluşturulmaktadır. Bu süreçte kolondan geçen proteinler kendi izoelektrik noktaları ve kolon içindeki pH değerine göre kolondan dışlanmakta veya tutulmaktadır. Başka bir deyişle kolondan geçen proteinlerin ayırımı pI değerlerinin kolon içi pH’sına göre yüksek, düşük veya aynı değerde oluşuna göre gerçekleşmektedir. Protein örneği, sisteme yüklendikten sonra ilk 20-40 dakika kolondan sadece başlangıç tamponu (pH 8.5) geçmekte, bu süreçte pI’sı 8.5’den büyük olan proteinler kolondan atılarak zamana bağlı olarak fraksiyonlanmaktadır. Süre sonunda sistemde yavaş yavaş pH değeri 4.0 olan elüsyon tamponu akışı başlatılmaktadır. Böylece yöntemde belirtilen süreye bağlı olarak 1. boyut kolonunun iç pH’si, 8.5’den 4.0’e kadar yavaş yavaş (0.3 birim aralıkla) düşürülmektedir. Gradyent sırasında proteinin pI değeri kolon içi pH’sından yüksek ise kolondan atılmakta, aynı değere sahip ise kolonda asılı kalmakta ve eğer düşükse kolon iç yüzeyinde tutulmaktadır (Şekil 2.8). Kolondan çıkan proteinler, 96

kuyulu mikroplakalarda toplanmadan önce UV-1 detektörün önünden geçmektedir. Bu dedektör 280 nm’de proteinlerin absorbans değerini ölçerek 1. boyut kromatogramını oluşturmaktadır. Başlangıç tamponu geçişi durup tamamen elüsyon tamponununun geçişi gerçekleştiğinde ise kolon içi pH’sı 4.0 e indirilmiş olur. Sadece elüsyon tamponu geçişinin olduğu son 20 dakika boyunca da zamana bağlı olarak asidik proteinlerin ayırımı gerçekleşmektedir. Tüm ayırım süresince kolondan çıkan proteinlerin 280 nm’deki absorbansları UV-1 detektör tarafından ölçülerek varlığı ve miktarını gösteren “UV-1 kromatogramı”na dönüştürülmektedir. pH gradiyenti tamamlandıktan sonra kolon HISS solüsyonu ile yıkanmaktadır. Bu solüsyon pH 4.0’da kolondan ayrılmamış olan proteinleri kolondan uzaklaştırmaktadır.





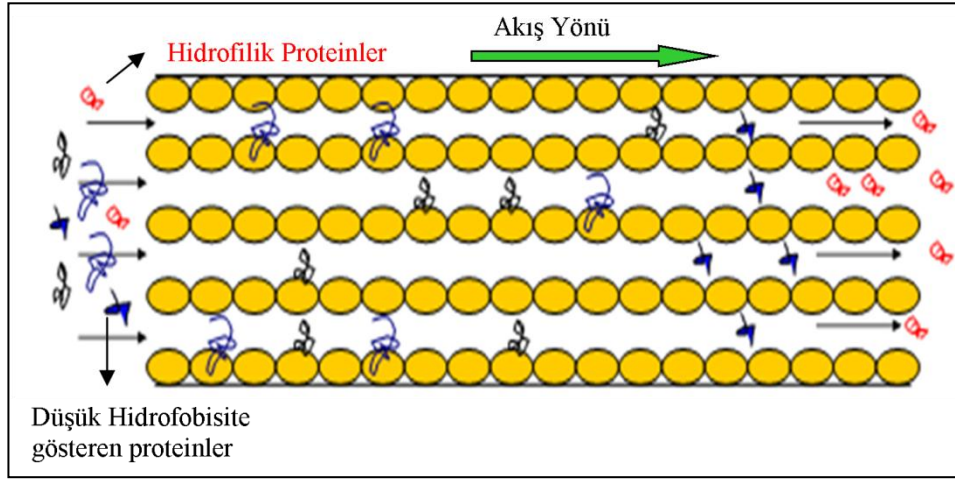
Şekil 2.8: Birinci boyut kolonunda proteinlerin pI noktalarına göre ayırımı.

- A- İlk 20 dakika kolon içi pH değeri, başlangıç tamponundan dolayı 8.5'dir. Bu süreçte pI değeri 8.5'den büyük olan proteinler (Protein1) itilerek kolondan atılır, pI değeri daha düşük olan proteinler ise kolon yüzeyinde tutulur (Protein2).
- B- 20 dakika sonunda elüsyon tampon akışının başlatılmasıyla kolon iç pH değeri düşmeye başlar. Böylece bir pH gradienti boyunca önce kolon iç yüzeyinde tutulan proteinler (Protein2) kolon iç pH'si kendi pI değerinde ise kolon içinde asılı kalırlar.
- C- Kolon iç pH değeri eğer proteinin (Protein2) pI noktasından daha yüksek ise bu durumda protein kolon iç yüzeyine tutunmaktadır.
- D- pH gradienti boyunca kolon içi pH'nın sürekli azalmasıyla kendi pI noktasından daha düşük bir ortama giren proteinler (Protein2) serbest kalarak ve itilerek kolondan atılır.

### 2.5.2. İkinci Boyut Ayırım

Birinci boyutta ayırım sırasında fraksiyonlanan her bir kuyucuktaki protein karışımının 200  $\mu$ L'si otomatik olarak 2. boyut ayırım için HPRP kolonuna transfer edilir. Bu karışımda yer alan proteinler, hidrofobisite özellikleri temel alınarak HPRP kolonunda  $H_2O$  ve asetonitril ile oluşturulan hidrofobisite gradienti sayesinde

ayırılmaktadır (Şekil 2.9). Bunun için, başlangıçta kolondan %100 H<sub>2</sub>O geçişi ile hidrofilik proteinlerin ayırımı gerçekleştirilirken daha sonra yavaş yavaş asetonitril geçişi başlatılmakta ve %100 asetonitrile doğru bir gradiyent akışı sağlanmaktadır. Böylece kolon içinde polardan apolara doğru bir ortam sağlanmakta ve hidrofobisite özelliği en düşük olan proteinlerden başlanarak gradiyent boyunca hidrofobisitesi artan proteinlerin ayırımı gerçekleştirilmektedir. Kolondan ayrılan proteinler zamana bağlı olarak (0.75 mL/0.5 dakika) 2. boyut fraksiyon toplayıcıda 96 kuyulu mikrolakalarda fraksiyonlanmaktadır. Son olarak da %100 asetonitril geçişiyle hidrofobisitesi en yüksek olan proteinlerin ayırımı yapılmakta ve 2. boyutta ayırım tamamlanmaktadır.



Şekil 2.9: İkinci boyut kolonunda proteinlerin hidrofobitesine göre ayırımı (Proteinler mobil fazda kolona girer. Hidrofobik proteinler, kolonun hidrofobik yüzeyi tarafından tutulur ve ilk olarak hidrofilik proteinler kolondan çıkarlar. Daha sonra mobil fazdaki bileşenlerin oluşturduğu hidrofobisite gradienti boyunca affinitesi azaldıkça proteinler serbest hale geçerek kolondan çıkarılır.)

Bu modülde bulunan UV detektör, 214 nm dalga boyundaki kolondan geçen proteinlerin peptid bağları tarafından absorplanan ışınları ölçerek daha hassas biçimde protein tayini yapmaktadır. Böylece elde edilen UV piklerinin her biri bir proteini temsil etmekte ve her fraksiyon için bu piklerden oluşan “UV-2 kromatogramı” oluşturulmaktadır. Bu süreç 1. boyutta ayrılan ve 2. boyuta transfer edilen her fraksiyon için tekrarlanmaktadır.

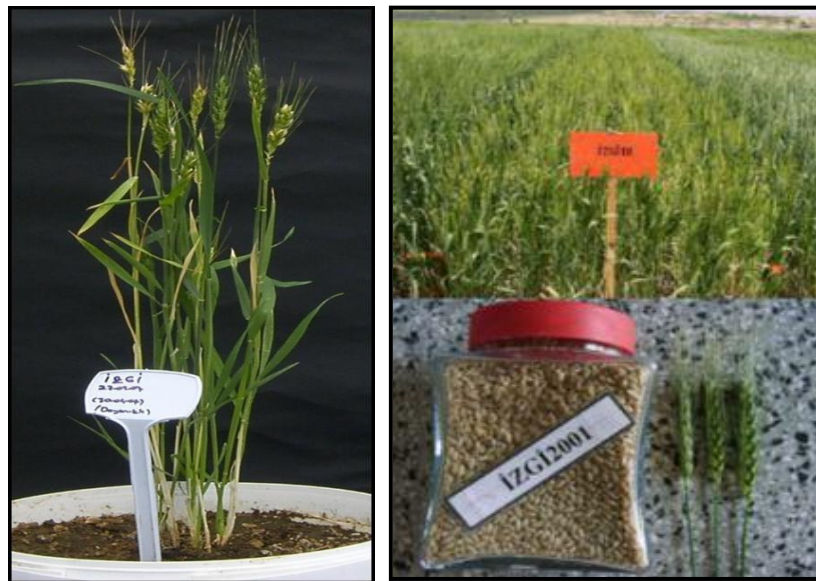
### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ MATERYALİNİN HAZIRLANMASI

Bitki materyallerinin hazırlığı kapsamında, tohumların ekimi, bitkilerin yetiştirilmesi ve patojenle inokülasyon çalışmaları TÜBİTAK, 109T293 no'lu COST projesi kapsamında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)'ne bağlı Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü (TARM) proje personeli tarafından yapılmıştır. Örnek alımı ise TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE) proje personeli tarafından inokülasyonu takip eden 24, 48, 72 ve 96. saatlerde gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak, TAGEM'e bağlı Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ATAE) tarafından geliştirilerek tescil edilmiş olan, sarı pasa dayanıklı, kışlık ekmeçlik buğday çeşidi "İzgi 2001" (Şekil 3.1), patojenin hastalık oluşturma yetisinin değerlendirilmesi amacıyla da sarı pas hastalığına hassas buğday çeşidi "Little Club" kullanıldı.



Şekil 3.1: İzgi 2001 çeşidi buğday örnekleri (ATAE, 2012)

İzgi 2001 çeşidi, sarı pas hastalığı etmeni olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'ye karşı dayanıklı bir genotip olması ve daha önce gerçekleştirilen projelerde moleküler düzeydeki çalışmaların yapıldığı yerel bir çeşit olması nedeniyle tez çalışmasında dayanıklılık mekanizmasında rol oynayan proteinlerin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Çeşide ait özellikler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: İzgi 2001 çeşidine ait özellikler (ATAE, 2012).

<b>Morfolojik Özellikleri</b>	
Kılçıklı	
Başak Rengi	Beyaz
Dane Rengi	Beyaz
Boy:	95-105 cm
<b>Tarımsal Özellikleri</b>	
Kısa dayanıklılığı:	İyi
Kardeşlenme:	Orta-Yüksek
Erkencilik:	Erkenci
Yatma:	Dayanıklı
<b>Verim Özellikleri</b>	
Ortalama:	300 kg/da
Min-Maks:	200-500 kg/da
<b>Teknolojik Özellikleri</b>	
Bintane Ağırlığı	34-35 g
Hektolitre Ağırlığı	79-81 kg
Sedimentasyon Değeri	30-40 mL
<b>Hastalık ve Zararlı:</b>	Sarı pas, sürme ve راستیغا dayanıklı

### 3.1.2. Patojen Kaynağı

Tez kapsamında, ülkemiz İç Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösteren, sarı pas hastalığı etmeni *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* fungusu patojen kaynağı olarak kullanıldı. Patojenin ürediosporları, TARM Ankara, Haymana İkizce Araştırma ve Uygulama Çiftliği Hastalıklara Dayanıklılık Islahı Bölümü tarlasından 2009 Mayıs-Haziran aylarında toplandı ve TARM seralarında, kontrollü koşullarda, hassas çeşitler üzerinde çoğaltıldı.

Çoğaltılan sporlar tez çalışmasında kullanılacak bitki materyalinin inokülasyonundan hemen önce toplanarak taze olarak kullanıldı (Şekil 3.2).



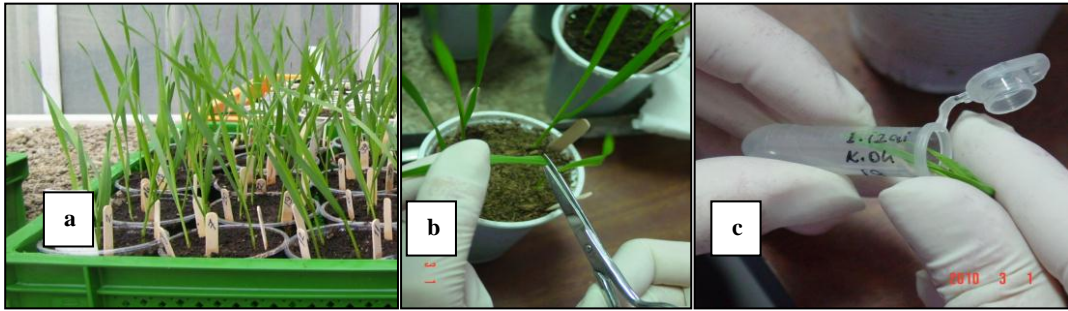
Şekil 3.2: Patojen sporlarının enfeksiyon için hazırlanması.

(A, B, C; Tez materyalinin inokülasyonunda kullanılmak üzere hassas çeşit üzerinde çoğaltılarak taze spor üretimi, D; Çoğaltılan ürediosporların mineral yağ ile karıştırılarak inokülasyona hazırlanması)

### 3.1.3. Bitkilerin Enfekte Edilmesi

Tezde, bitkinin sarı pas etmenine karşı göstermiş olduğu dayanıklılık cevabında rol alan proteinleri belirlemek üzere, patojen bulaştırılmış (enfekte) örneklerle, karşılaştırma yapılacak kontrol örnekler arasında, patojen dışında başka bir uyarının bulunmaması sağlandı. Bu amaçla kontrol bitki materyali ile enfekte edilecek bitki materyali aynı zamanda ve aynı biçimde ekilerek aynı fiziksel koşullar altında yetiştirildi. Bitkiler iki yapraklı döneme geldiğinde inokülasyon çalışmaları gerçekleştirildi. İnokülasyon aşamasında, sarı pas sporları ile inoküle edilen bitkilerle patojen sporları içermeyen ancak diğer tüm inokülasyon işlemleri içeren boş (mock) inokülasyona tabii tutulan kontrol bitki örnekleri aynı zamanda ve aynı koşullar altında yetiştirildi. Her bir zaman dilimi için etiketlenen 80 bitkiden 40'ı *Puccinia striiformis f. sp. tritici* ürediosporlarının mineral yağ içerisine karıştırılarak bitkilere püskürtülmesi şeklinde, diğer 40 bitki ise kontrol amaçlı olarak sadece mineral yağın

bitkilere püskürtülmesi şeklinde inoküle edildi. İnokülasyonu takiben enfekte bitki materyali ile kontrol bitki materyalleri birbirinden ayrı ancak aynı fiziksel koşullara sahip sera koşullarında muhafaza edildi. Yapılan inokülasyon denemelerinin başarısını test etmek amacıyla, eş zamanlı olarak hassas bitkilere de patojen bulaştırıldı. Ayrıca çalışma materyalini oluşturan bitkilerde inokülasyonun başarılı biçimde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek üzere numaralandırıldı ve her bitkinin bir yaprağı örnek olarak alınırken diğer yaprağı enfeksiyon cevabını gözlemek üzere bırakıldı (Şekil 3.3). Alınan örnekler derhal sıvı azot içerisinde donduruldu ve protein ekstraksiyonu yapılmaya kadar  $-86^{\circ}\text{C}$ 'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Bitki üzerinde bırakılan diğer yaprak ise inokülasyonun başarılı olup olmadığını değerlendirmek üzere 20 gün boyunca gözlemlendi. Bu süreç sonunda tüm bitkilerde tek tek inokülasyon değerlendirmesi yapıldı ve enfeksiyon cevabı aynı şiddette gerçekleşen bitkilere ait yapraklar proteom analizlerinde kullanıldı.

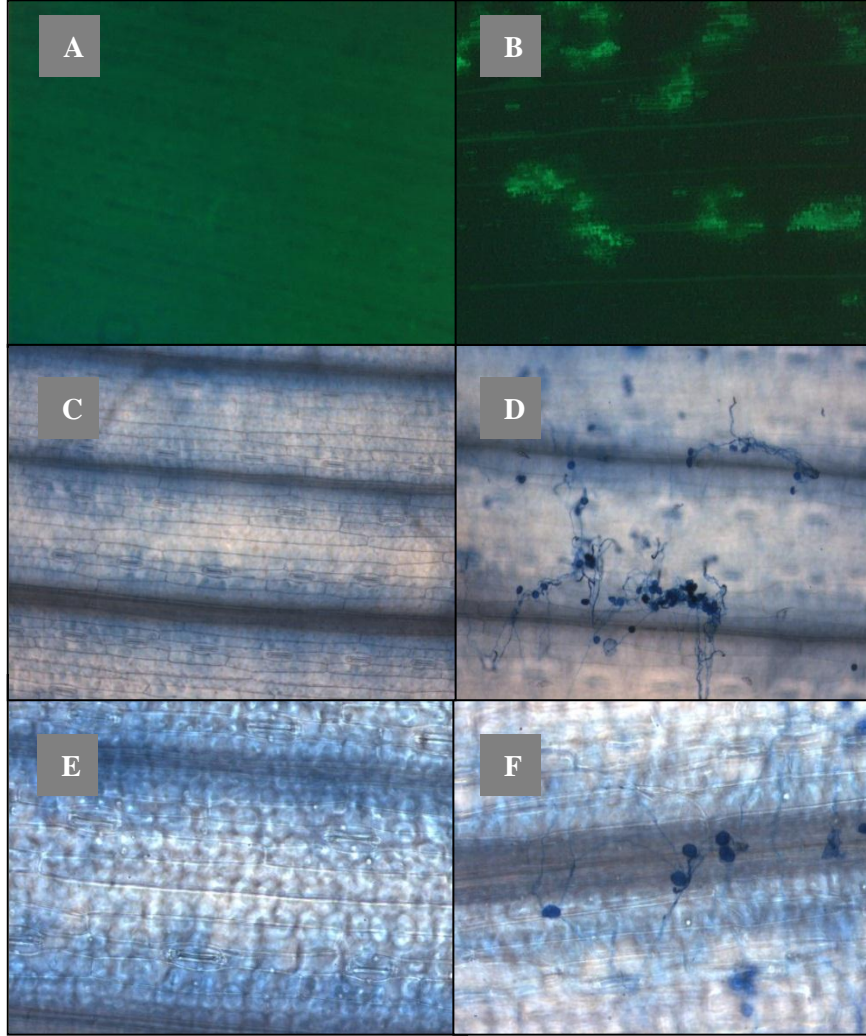


Şekil 3.3: Bitki materyalinin hazırlanış aşamaları.

- a. Her bir bitkinin tek tek etiketlenip grup grup depolanması. b. Yaprak örneklerinin alınması. c. Alınan örneklerin ayrı ayrı etiketlenmiş tüplere yerleştirilmesi.

### 3.1.4. Enfeksiyon Cevabının Mikroskopik Olarak İncelenmesi

İnokülasyonun kontrolü amacıyla bitki üzerinde bırakılan yapraklardan inokülasyonun 5. gününde alınan örneklerde, mikroskopik çalışmalar yapılarak bitkilerdeki enfeksiyon cevabı incelendi. Hassas çeşit Little Club'da patojenin yaprak hücrelerine girişi ve hif yapılarının gelişimi tripan mavisi yöntemiyle gösterildi. Tez çalışmasında kullanılan İzgi 2001'de ise dayanıklılık cevabının ilk göstergesi olan ve HR olarak adlandırılan programlı hücre ölümü; ölen hücrelerde biriken fitoaleksinin, gliseolin gibi bileşiklerin floresan ışığa özelliğinden yararlanılarak floresan mikroskopta gösterildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Yapılan inokülasyon çalışmalarında enfeksiyon cevabının mikroskopik olarak görüntülenmesi

A. Kontrol amaçlı boş inokülasyon yapılan İzgi 2001 bitki yaprağının floresan mikroskop altındaki görüntüsü, B. Patojenle inoküle edilmiş dayanıklı çeşit İzgi 2001’de enfeksiyon cevabı olan HR bölgelerinde floresan ışımaya, C/E. Kontrol amaçlı boş inokülasyon yapılan LC bitkilerinde tripan mavisi boyama yöntemi sonucu yaprak görünümü, D/F. Hassas çeşit LC’de trypan blue boyama yöntemi ile patojen sporlarında hif gelişiminin görünümü.

### 3.1.5. Enfeksiyon Cevabının Makroskopik Olarak İncelenmesi

Enfeksiyonun gözlenmesi için kullanılan mikroskopik yöntemlerin yanı sıra makroskopik gözlem de gerçekleştirildi. Bu amaçla inokülasyonun 16. gününde tüm bitkilerde yaprak yüzeyinde gözlenen belirtiler (Şekil 3.5) Mc Neal (Mc Neal, ve diğ., 1971) skalasına göre değerlendirildi. Bundan 2-3 gün sonra da ikinci değerlendirme yapılarak her bitki için enfeksiyon cevabı skorlandı. Bu skalada 0-6 arasındaki bitkiler dayanıklı, 7-9 arası değer alan bitkiler ise hassas olarak kabul edilmektedir. Tez bitki materyalini oluşturan İzgi 2001 çeşidinde tüm bitkiler beklendiği biçimde 0-1 skala değerini almış olup hastalık belirtisi gözlenmemiştir.



Şekil 3.5: Dayanıklı ve hassas çeşitlerin makroskobik görüntüsü.

## 3.2. PROTEİN ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

### 3.2.1. Protein İzolasyonu

Bitki örnekleriyle, özellikle bitkinin yeşil kısımlarıyla çalışıldığında elde edilen total proteinlerin yaklaşık %50'sini fotosentezde rol alan RuBisCo (Rubiloz-bifosfat karboksilaz) alt birimleri oluşturur. Bu durum düşük anlatım düzeyine sahip proteinlerin ve RuBisCo alt birimleriyle özdeş pI noktasına sahip olan proteinlerin görüntülenmesini ve tanımlanmasını engeller. Bu engelleme önüne geçmek ve dayanıklılık mekanizmasında rol alan proteinleri yüksek bir verimlilikle belirleyebilmek amacıyla izolasyon RuBisCo alt birimlerini uzaklaşırın Mg/NP40 yöntemi ile gerçekleştirildi (Kim ve diğ., 2003). Bu yöntemde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler Tablo 3.2'de verildi.



Tablo 3.2 Protein izolasyonu için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları

<b>Kimyasal/çözelti Adı</b>	<b>İçeriği</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Poli(vinil poli-pirolidon) (PVPP- Fluka 77627)	0.1 g PVPP (1 g doku için)	Her 1 g doku için 0.1 g olacak şekilde tartıldı.
Lizis Tamponu	0.5 M TrisHCl pH 8.3 (Roche 122010), % 2 Igepal (v/v) (Sigma I7771), 20 mM MgCl <sub>2</sub> (Sigma M8266), %2 Beta Merkaptotanol, (Applichem A1108), 1 mM PMSF (Fenil metan sülfonil florid) (Sigma P7626)	Tüm bileşenler tartılıp 50 mL dH <sub>2</sub> O ile çözüldürüldü ve son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
%50 PEG4000 (Poli etilen glikol);	50 g PEG4000 (Sigma 95904)	Bileşen tartılıp 50 mL dH <sub>2</sub> O içerisinde çözüldürüldü.
Proteaz İnhibitör Karışımı (Sigma P2714)		1 mL dH <sub>2</sub> O ile çözüldürüldü ve 1 g dokuya karşılık 50 µL olacak şekilde kullanıldı.
Çözüldürme Tamponu	7.5 M Üre (Sigma U0631), 2.5 M Tiyoüre (Sigma T7875), %12.5 (v/v) Gliserol (Sigma 6279), 62.5 mM TrisHCl pH 7.8, 6.25 mM Tris (2 karboksietil fosfin, TCEP) (Sigma C4706), %12.5 (w/v) n-oktilglikozit (OG) (Sigma 08001)	Bileşenler tartılıp dH <sub>2</sub> O çözüldürüldü ve 50 mL'ye tamamlandı.

İzolasyonda sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

- 1) -86°C'lik dondurucudan alınan örnekler sıvı azot içinde muhafaza edilerek bir araya getirildi ve 1 g dokuya karşılık 0.1 g PVPP ilave edildi.
- 2) Yaprak dokuları sıvı azot ile dondurularak vibrasyonlu öğütücüde (RETSCH MM301) iyice toz haline getirildi.
- 3) Toz haline getirilmiş olan yaprak dokularının üzerine 30 ml lizis tampon ilave edildi ve 15 dakika buz banyosunda bekletildi.
- 4) Karışım 1000 xg'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek hücre artıklarının çökmesi sağlandı ve süpernatant yeni tüpe aktarıldı.
- 5) Süpernatant üzerine son hacmin %15'i olacak şekilde %50'lik PEG4000 solüsyonu eklendi ve 30 dakika buz banyosunda bekletildi. Bekleme sürecinde, karışım 10'ar dakika aralıklarla vortekslendi.
- 6) Süre sonunda RuBisCo proteinleri 17000 xg'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
- 7) Yeni tüpe alınan süpernatantın üzerine geri kalan proteinlerin çökmesi için 4 hacim soğuk aseton ilave edilerek -20°C'de gece boyu bırakıldı.

- 8) Ertesi gün 23000 xg'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı.
- 9) Protein çökeltisini pigmentlerden temizlemek amacıyla pellet üzerine 10 mL soğuk aseton ilave edilip vortekslendi ve en az 30 dakika -20°C'de bırakıldı.
- 10) 4300 xg'de +4°C'de 10 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atıldı. Bu işlem pellet temizlenene ve süpernatant renksizleşene kadar 3-4 kez tekrar edildi.
- 11) Son yıkamadan sonra üst sıvı atıldı ve protein çökeltisi aseton kokusu gidene kadar (yaklaşık 30 dakika) çeker ocakta kurumaya bırakıldı.
- 12) Pellet kuruduktan sonra 1 mL çözündürme tamponu ve 150 µL taze hazırlanmış proteaz inhibitör karışımı eklenerek çözündürüldü. Çözünmeyi artırmak üzere 7 W'da 5 kez 5 saniye sonikasyon (MSE soniprep 150) uygulandı.
- 13) Karışım 30000 xg de 22°C'de 30 dakika santrifüj edildi.
- 14) Protein çözeltisi, ultrasantrifüj tüplerine aktararak 100000 xg de 22°C'de 1 saat santrifüj (Beckman Coulter Optima MAX) edilerek düşük molekül ağırlığına sahip moleküller çöktürülerek uzaklaştırıldı.
- 15) Süpernatantın 100 µL'si protein konsantrasyon tayini ve tek boyutlu SDS-PAGE analizi için ayrıldı. Kalan kısmı LoBind (Eppendorf, 022431081) tüplere alınarak PF2D sisteminde iki boyutlu ayırımı yapılmaya kadar -86°C'de saklandı.

### 3.2.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu modifiye Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976). Bu yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Öncelikle bovine serum albumin (BSA) proteini ile 0-300 µg/mL konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı (Tablo 3.3). Standartlar analiz edilecek proteinlerin çözündürüldüğü çözündürme tamponunda hazırlandı. Çözündürme tamponundaki kimyasalların Bradford reaktifi ile etkileşimini en aza indirmek için hem örnekler hem de standartların hazırlığında kullanılan çözündürme tamponu HPLC için uygun su ile 1:10 (v/v) oranında sulandırıldı.

Tablo 3.3: BSA standartlarının hazırlanması

BSA Standart Konsantrasyonları ( $\mu\text{g/mL}$ )	Stok BSA (1 mg/mL)'dan alınan hacimler ( $\mu\text{L}$ )	1/10 (v/v) Sulandırılmış Çözündürme Tamponundan Alınan Hacimler ( $\mu\text{L}$ )
0	-	500
50	25	475
100	50	450
150	75	425
200	100	400
250	125	375
300	150	350

Örnek ve standartlar hazırlandıktan sonra 10'ar  $\mu\text{L}$  alınarak 3'er tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaların kuyucuklarına koyuldu. Üzerlerine 200  $\mu\text{L}$  1x Bradford reaktifi (Bio-Rad 500-0006) eklendi. Mikropalaka 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda oluşan renkli bileşiğin 595 nm'deki absorbansı mikropalaka okuyucu ile (Bio-rad 3550) ölçüldü. Standartlara ait veriler kullanılarak standart grafik oluşturuldu. Örneklere ait absorbans değerleri standart grafiğin doğru denklemi yardımıyla değerlendirildi ve örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

### 3.3. ELEKTROFORETİK ANALİZLER

İzole edilen proteinlerin kalitatif analizi, tek boyutlu sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile gerçekleştirildi (Walker, 2002).

#### 3.3.1. Jelin Hazırlanması

Elektroforezde kullanılan tüm cam malzemeler ve jel kaseti sıvı deterjan ile yıkayıp ardından distile sudan geçirilerek durulandı. Bu işlemin ardından jel kaseti için gerekli cam plaklar etanol ile silindi ve kağıt mendil (kimwipes) ile partikül kalmayacak şekilde kurulandı. Jel kaseti çalışmada kullanılan elektroforez sisteminin kitapçığında belirtildiği şekilde hazırlandı. %12.5 akrilamid içeren ayırma jelini hazırlamak üzere 2.5 mL TrisHCl (1.5 M, pH 8.8), 2.26 mL distile su ( $\text{dH}_2\text{O}$ ), 10  $\mu\text{L}$  SDS (% 10 w/v), 4.17 mL Akrilamid/Bisakrilamid (29:1 w/w) iyice karıştırılıp polimerizasyonu engelleyen oksijeni uzaklaştırmak için 15 dakika vakumda bekletildi. Ardından karşıma polimerizasyonu sağlamak üzere polimerizasyon

başlatıcı % 10 (w/v) amonyum persülfat (APS, Sigma A9164) ve katalizör Tetra metil etilen diamin (TEMED, Sigma T7024)'den 10 µL eklenip hava kabarcığı oluşturmamaya özen gösterilerek iyice karıştırıldı ve bu karışım kasetin 4/5'ini dolduracak şekilde enjektör yardımıyla iki cam arasına boşaltıldı. Polimerizasyon sırasında jelin üst yüzeyinde düzgün bir hat oluşması ve yüzeyin oksijen ile temasını engellemek için, yüzeyi örtecek şekilde suyla doyurulmuş bütanol enjekte edildi. Jel kaseti polimerizasyonun gerçekleşmesi için hiç hareket ettirilmeden yaklaşık 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra üst kısımda bulunan suyla doyurulmuş bütanol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı ve yüzey birkaç kez dH<sub>2</sub>O ile yıkandı.

Total akrilamid oranı %4.5 olan yükleme jelini (üst jel) hazırlamak üzere 625 µL TrisHCl (1 M, pH6.8), 3.59 mL distile su (dH<sub>2</sub>O), 5 µL SDS (% 10 w/v) ve 750 µL Akrilamid/Bisakrilamid (29:1 w/w) iyice karıştırılıp oksijeni uzaklaştırmak için vakumla 15 dakika bekletildi. Ardından karışıma %10 (w/v) APS ve 10 µL TEMED ilave edilip köpük oluşturmada dikkatle karıştırıldı ve jel kasetinin tamamını doldurana kadar ayırma jelinin üzerine döküldü. Yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirildikten sonra polimerize olması için yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Jel polimerize olduktan sonra, tarak çıkarılıp kuyucuklar dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Jel kaseti elektroforez tankına yerleştirildi. Tank, jel kasetinin üzerini kapatacak şekilde 1x yükleme tamponu ile dolduruldu ve her kuyucuk bu tamponla yapılan pipetajlar ile yıkandı ve örnek yüklemeye hazır hale getirildi.

### **3.3.2. Proteinlerin Jele Yüklenmesi**

İzole edilen total protein örneklerinden 10 µL alınarak üzerine 2 µL yükleme boyası ilave edilip karıştırıldı ve 3 dakika boyunca 95°C'de inkübe edilerek proteinlerin denatüre edilmesi sağlandı. Ardından bir kuyucuğa da 5 µL protein belirteci ve kalan her bir kuyucuğa 12 µL örnek boya karışımı yüklendi. Protein karışımları ayırma tamponuna gelene kadar (10-15 dak) 80 V, daha sonra ise 120 V elektrik akımı uygulanarak yaklaşık 1 saat yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra Coomassie boyama yöntemi kullanılarak protein bantları görüntülendi. Bu yöntemde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler Tablo 3.4'de verildi.

Tablo 3.4: Protein örneklerinin jele yüklenmesi ve yürütme işlemi için gerekli tamponlar

<b>Kimyasal/çözelti Adı</b>	<b>İçeriği</b>	<b>Hazırlanışı</b>
10x yürütme tampon	30 g Tris base, 144 g Glisin, 1 g SDS	Bileşenler 500 mL dH <sub>2</sub> O'da çözündürüldü ve hacim 1 L'ye tamamlandı.
Örnek yükleme boyası	% 1 SDS, % 0.1 bromofenol blue	Bileşenler tartılarak 1 mL dH <sub>2</sub> O' da çözündürüldü.

### 3.3.3. Jelin Boyanması

Yürütme sonrası jel kasetten çıkartıldı, tabanı düzgün bir kaba alınarak bantların görünür hale gelmesi için üzerine hazırlanmış olan Coomassie boyasından 40 mL eklenip 1 saat çalkalayıcıda bekletildi. Bu işlemin ardından Coomassie boya uzaklaştırılıp jelde sadece bantların boyanması, diğer kısımlardaki boyalarının uzaklaştırılması için hazırlanan yıkama (destaining) solüsyonundan 40 mL eklendi. Gerekli boyaların içerikleri ve hazırlanışları Tablo 3.5'de verildi.

Tablo 3.5: Jelin boyanması için gerekli boyaların içeriği ve hazırlanışı

<b>Kimyasal/çözelti Adı</b>	<b>İçeriği</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Coomassie Boyası	% 0.1 (w/v) Coomassie Brilliant Blue (R-250-Sigma B0149), % 50 (v/v) etanol, % 10 (v/v) asetik asit	Bileşenler karıştırıldı ve 1 L'ye dH <sub>2</sub> O ile tamamlandı.
Yıkama (Destaining) Solüsyonu	% 10 metanol, % 7 asetik asit	100 mL metanol ve 70 mL asetik asit alınarak dH <sub>2</sub> O ile 1 L'ye tamamlandı.

## 3.4. PROTEİNLERİN SIVI KROMATOĞRAFİ SİSTEMİ (PF2D) İLE İKİ BOYUTLU AYIRIMI

Tez çalışmasında proteinlerin analizi 2D-PAGE'ye alternatif olarak geliştirilmiş iki boyutlu sıvı kromatografi (2D-LC) sistemi olan ProteomeLab PF2D (protein fractionation 2 dimensional) sistemi ile gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan PF2D sisteminin düzgün biçimde çalışabilmesi için gerekli olan hazırlık aşamaları ve cihaza ait tüm işlemler "Beckman Coulter PF2D Operator's Manual'de gösterildiği şekilde yapıldı ve tüm aşamalar aşağıda belirtildi.

### 3.4.1. Cam Malzemelerin Hazırlanması

Tüm HPLC sistemlerinde olduğu gibi PF2D sistemi ile kullanılacak olan tüm cam malzemeler herhangi bir yağ ve protein kirliliği taşımaması için özel bir yıkama işleminden geçirilir. Bunun için tüm cam malzemeler deterjanla yıkanıp, saf sudan geçirilerek kurutuldu. Daha sonra tüm malzemeler sırasıyla HPLC için uygun su (JT Baker, 4218), 2-propanol (Riedel-de Haen, 24137) , diklorometan (Sigma, 34856) ve hekzan (Sigma, 34859) ile yıkandı. Daha sonra tekrar diklorometan ve 2-propanolden geçirilip son olarak HPLC için uygun su ile durulanarak kurutuldu.

### 3.4.2. Solüsyonların Hazırlanması

PF2D sistemi, proteinlerin farklı özelliklerini temel alarak ayırım yapan iki modülden oluşmaktadır. Proteinlerin izoelektrik noktalarına (pI) göre ayıran modül (birinci boyut); “High Performance Chromatofocusing Fractionation” (HPCF) kolonu. Proteinlerin birinci boyutta ayırımı için bir pH gradienti (8.5–4.0) oluşturulmak üzere “Başlangıç Tampon” (BT, pH 8.5) ve “Elüsyon Tampon” (ET, pH 4.0) hazırlandı. Örneklerin kolondan geçişi tamamlandıktan sonra kolonun temizliği, yüksek iyonik kuvvetli solüsyon (HISS) adı verilen 1 M NaCl solüsyonu ve HPLC için uygun su ile yapıldı. Proteinlerin 1. boyut ayırımında, sağlıklı bir pH gradientinin oluşturulması son derece önemli olduğundan başlangıç ve elüsyon tamponlarının hazırlanmasına (Barre ve Solioz, 2006) büyük özen gösterildi ve bu tamponlar her bir zaman dilime ait örneklerin ayırımına başlanmadan önce taze olarak hazırlandı. Ayrıca her bir zaman dilime ait örneklerin (3 biyolojik tekrara ait kontrol ve enfekte örnekler) ayırımında aynı başlangıç ve elüsyon tamponlar kullanıldı. Gerekli tamponlar ve hazırlanışları Tablo 3.6’da verildi.

Tablo 3.6: PF2D 1. boyut analizleri için solüsyonların içeriği ve hazırlanışı

Tampon Adı	İçeriği	Hazırlanışı
Başlangıç Tampon	6 M üre (Sigma, U0631), 25 mM Bis-Tris (Sigma 14879), %0.2 n-oktil gliko piranosit (Sigma 08001)	Bileşenler tartılıp HPLC sınıfı suda (JT Baker, 4218) çözüldü. Çözünme işleminden sonra 1 M amonyum hidroksit ile pH 8.5'e ayarlandı HPLC grade su ile 1 L'ye tamamlandı.
Elüsyon Tampon	6 M üre, % 10 v/v Polybuffer (GE Healthcare 71-1170-00-EF), % 0,2 n-oktil gliko piranosit	Bileşenler HPLC sınıfı suda çözüldü. Tamponun pH'sı iminodiasetik asit ile 4'e ayarlandıktan sonra hacmi HPLC sınıfı su ile 1 L'ye tamamlandı
Yüksek İyonik Kuvvetli Solüsyon (HISS)	1 M NaCl	Bileşen tartıldı ve HPLC sınıfı suda çözülerek 1 L'ye tamamlandı.

Hazırlanan başlangıç, elüsyon ve HISS tamponlar 0.2 µm por çaplı selüloz asetat membran filtreden (Whatman OE 67) geçirilip ışık almaması için alüminyum folyo ile kaplanmış cam şişe içinde +4°C'de muhafaza edildi.

Proteinlerin hidrofobik etkileşimlerine göre ayıran modül olan ikinci boyut aşamaları için; "Yüksek Performanslı Ters Faz" (High Performance Revers Phase - HPRP) kolonu (Eprogen A61689), hidrofobisite gradiyenti oluşturulması için gerekli olan HPLC için uygun su ve asetonitril (JT Baker, 9821) iyon baskılayıcı ajan olarak TFA (trifluoroacetic acid, JT Baker 9470) ilave edilerek hazırlandı. Solüsyonların içerikleri ve hazırlanışları Tablo 3.7'de verildi.

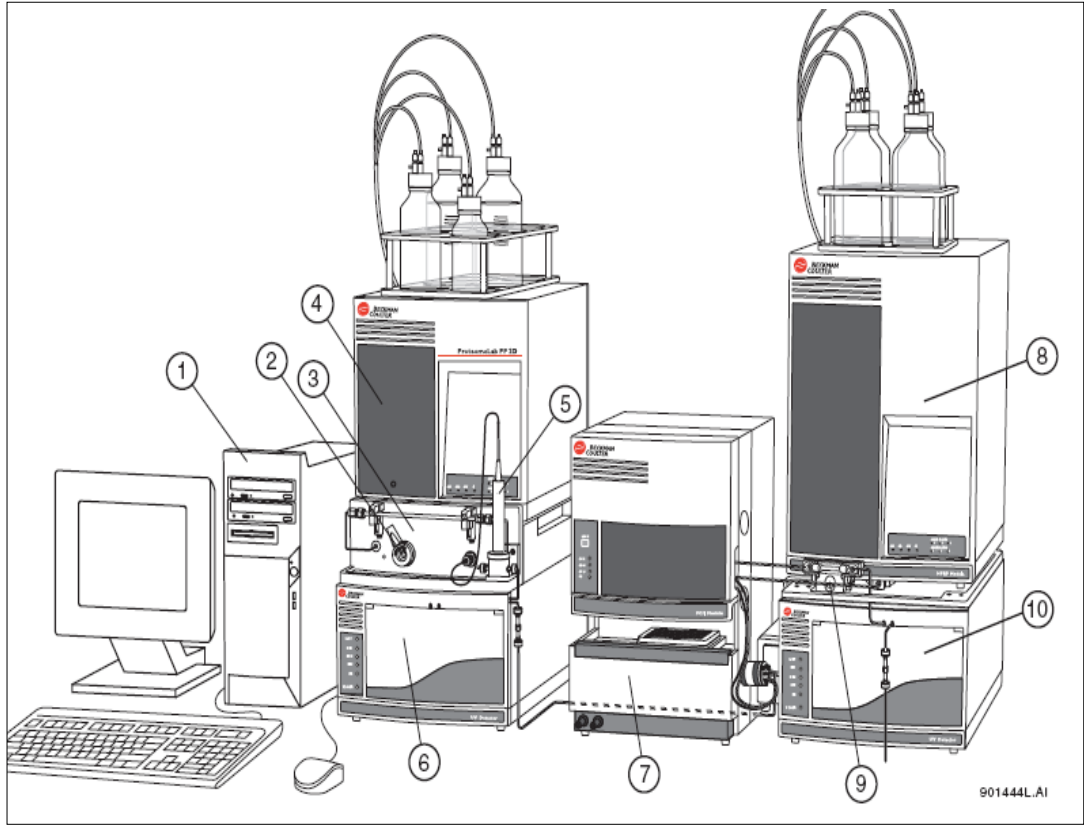
Tablo 3.7: PF2D 2. boyut analizleri için solüsyonların içeriği ve hazırlanışı

Kimyasal/Çözelti Adı	İçeriği	Hazırlanışı
% 0.1 TFA içeren su (v/v)	HPLC sınıfı su, TFA (trifluoroacetic acid, JT Baker 9470)	1 L HPLC sınıfı su içine 1 mL (% 0,1) TFA koyularak iyice karıştırıldı.*
% 0,08 TFA içeren asetonitril (v/v)	A asetonitril (JT Baker, 9821), TFA (trifluoroacetic acid, JT Baker 9470)	1 L asetonitril (JT Baker, 9821) içine 800 µL (%0,08) TFA ilave edilerek iyice karıştırıldı.*

\*TFA son derece uçucu ve toksik olduğundan tüm işlemler çeker ocak altında gerçekleştirildi.

### 3.4.3. PF2D Cihazının Hazırlanması

ProteomeLab PF2D sistemi ve sistemi oluşturan kısımlar Şekil 3.6'da gösterildi. Sistemin birinci boyut modülü; Manuel enjektör, HPCF modülü, pH monitörü, UV detektörü ve fraksiyon toplayıcı (FC/I); ikinci boyut modülü; FC/I, HPRP modülü, kolon ısıtıcı ve UV detektörü kısımlarını içermektedir.



Şekil 3.6: Beckman Coulter PF2D sistemi ve bileşenlerinin şematik gösterimi.  
 1- Bilgisayar, 2- Manuel olarak enjeksiyon vanası 3- Sistem organizier 4- HPCF (Yüksek Performans Kromatofokuslama- High Performance Chromatofocusing) Modülü 5- pH monitörü, 6- UV-1 dedektörü 7- FC/I (Fraksiyon toplayıcı/Enjeksiyon- Fraction Collector/Injection) Modülü, 8- HPRP (Yüksek Performans Ters Faz – High Performance Reversed Phase) Modülü 9- Kolon Isıtıcısı 10- UV-2 Dedektörü

İki boyutlu ayırımı yapılacak bir protein örneği sisteme yüklenmeden önce cihazın hazırlığı için bir takım işlemler gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle başlangıç ve elüsyon tamponlarının  $+4^{\circ}\text{C}$ 'den oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı. Bu arada sisteme bağlı tüm modüller ve bilgisayar açılarak 32 Karat S/W programı çalıştırıldı. Sistem üzerindeki pH modülüne yerleştirilen pH probu, pH standartları (4.0; 7.0 ve 10.01) ile kalibre edildi. Oda sıcaklığına getirilen başlangıç ve elüsyon tamponlarının pH'ları bu prob ile kontrol edildi. Başlangıç tamponu için pH değerinin 8.5; elüsyon tamponu içinse 4.0 olması gerekmektedir. pH değerlerinin beklenenden farklı olduğu durumlarda pH'ı artırmak için amonyum hidroksit ve azaltmak için iminodiasetik asit ile pH ayarları yapıldı. Sistemde kullanılacak tüm tampon ve solüsyonlar (başlangıç ve elüsyon tamponlar, HISS, HPLC için uygunsu, TFA içeren su ve asetonitril) hazırlandıktan sonra ultrasonik su banyosunda 5 dakika tutularak hava



kabarcıklarından arındırıldı. Başlangıç ve elüsyon tamponlar ile HISS ve HPLC için uygun su şişeleri 1. boyut modülündeki uygun yerlerine yerleştirildi ve sisteme akış sağlayacak boru hatları şişelerin içine yerleştirildi. Tüm hatların açık olduğu ve sıvı akışının rahat biçimde sağlandığı, atık kanalının açık ve işler durumda olduğu kontrol edildi. Bilgisayar yazılımı üzerinden komut verilerek su hattından akış hızı 0.2 mL / 0.5 dakika olacak şekilde sıvı geçişi başlatıldı. Sıvı akışını sağlayan tüm hatlar tamamen su ile dolana kadar sistem ve pompa basıncı kontrol edildi. Daha sonra akış durdurularak kolonun yerinde bulunan boru hattı çıkartılıp 1. boyut kolonu (HPCF) sisteme yerleştirildi. Kolonun sıvı çıkış kısmı açık bırakılarak, akış hızı 0.2 mL / 0.5 dakika olacak şekilde ayarlandı ve su akışı başlatıldı. Bu sırada basınç ve kolonun giriş kısmından sıvı sızıntısı olup olmadığı kontrol edildi. Tüm sistem elemanlarının çalışmaya hazır olduğu belirlendikten sonra kolonun çıkış kısmının bağlantısı yapıldı. Ardından 1 saat boyunca kolondan su geçirildi ve kolonun giriş/çıkışlarında sıvı sızıntısı olup olmadığı tekrar kontrol edildi. Daha sonra 2. boyut modülü için gerekli olan %0.1 (v/v) TFA-su ve %0.08 (v/v) TFA-asetonitril solüsyonları modül üzerinde bulunan yerlerine yerleştirildi ve sisteme akış sağlayacak bağlantı boruları yerlerine yerleştirildi. 1. boyut modülünde olduğu gibi hatlardan sıvı akışının sorunsuz biçimde sağlandığı ve atık kanalının açık olduğu kontrol edildikten sonra 0.75 mL / 0.5 dakika akış hızı ile TFA-su solüsyonu geçirildi. Bu sırada pompa basınçları ve boru hatlarındaki sıvı geçişleri kontrol edildi. Daha sonra akış durdurularak 2. boyut kolonu (HPRP) sisteme monte edildi ve kolonun çıkış ucu açık bırakılarak sıvı akışı tekrar başlatıldı. Kolondan sıvı çıkışı gözlemlendikten sonra bu uç da kapatılıp her iki uçtan sızdırma olup olmadığı kontrol edildi ve kolon 50°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blok içine yerleştirildi. Ardından kolondan 1 saat süreyle 0.75 ml / 0.5 dakika akış hızında TFA-su geçişi sağlandı.

Sistemin her iki kolonundan da 1 saat su geçirildikten sonra, her iki modülün UV detektörlerinde bulunan lambaların kalibrasyonu yapıldı. Birinci boyut UV 280 nm boyutunda, ikinci boyut UV lambası da 214 nm dalga boyutunda kalibre edildi. Tüm bu hazırlıklar tamamlandıktan sonra HPCF kolonunun dengelenmesi ve kolon içi pH değerinin 8.5'a çıkarılması için 1. boyut modülünden aynı akış hızında başlangıç tamponu geçirilmeye başlandı. 210 dakika içinde kolon içi pH'sı 8.5'a ulaştıktan sonra ikinci boyut kolonun dengelenmesi için 5 dakika boyunca 0.75 mL / 0.5 dakika

akış hızında %0.08 (v/v) TFA içeren asetonitril ve ardından 5 dakika boyunca %0.1 (v/v) TFA içeren HPLC için uygun su geçirildi.

#### **3.4.4 Protein Örneklerinin Yükleme Hazır Hale Getirilmesi**

PF2D cihazına yüklenecek olan örneklerin tuzlardan arındırılarak başlangıç tamponu içerisine alınması gerekmektedir. Bunun için -86°C’de muhafaza edilen total protein örnekleri oda sıcaklığına getirildikten sonra PD-10 (GE Healthcare, W396289) kolondan geçirildi. Öncelikle PD-10 kolon bir tutturucuya yerleştirildi. Ardından altına 50 mL’lik bir beher yerleştirildi ve PD-10 kolonun alt ucu kesilerek kolon içeriğini koruyan sıvının akması sağlandı. Ardından kolondan 25 mL başlangıç tamponu geçirilerek proteinlerin tutunması için kolon içeriği dengelendi. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen örneklerin hacmi başlangıç tamponu ile 2.5 mL’ye tamamlanıp kolona yüklendi. Örnek tamamen kolondan geçtikten sonra 3.5 mL başlangıç tamponu kolona eklenerek bir iki damla atıldıktan sonra kalan kısım temiz bir tüpe toplandı. Daha sonra toplanan örneğin protein konsantrasyonu Bölüm 3.2.2’de belirtilen yöntemle tayin edildi.

#### **3.4.5. Protein Örneklerinin PF2D Sistemine Yüklenmesi ve Örneklerin Birinci ve İkinci Boyutta Ayırımı**

Örnekler cihaza yüklenmeden önce cihazın fraksiyon toplayıcı (FC/I) modülüne 1 adet 2 mL’lik 96 kuyulu özel mikrolaka (Greiner 780270) yerleştirilip modül üzerinde bulunan “Home” tuşuna basılarak plakanın yerini alması sağlandı. Daha sonra fraksiyon toplayıcıdaki iğnenin yıkanması için modülde ayrılan bölmeye %20’lik metanol eklendi ve sistemin yazılımında yer alan “Needle Wash” seçeneği aktifleştirilerek iğnenin yıkanması sağlandı. Ardından örnek fraksiyonlama işlemi boyunca mikrolakanın +10°C’de tutulması için FC/I modülünün soğutucusu açıldı. Aynı şekilde 2. boyut modülünde bulunan fraksiyon toplayıcıya da 2 mL’lik 96 kuyulu özel mikrolaklar (Greiner Bio-one 780270) yerleştirildi.

PD-10 kolondan geçirilerek tuzlarından arındırılan, başlangıç tamponu içine alınan ve konsantrasyonu belirlenen protein örneklerinden her yüklemde 3 mg protein olacak şekilde PF2D sistemine yüklendi. Bu işlem için öncelikle cihazın enjeksiyon girişi ve enjeksiyon iğnesi HPLC için uygun su ile yıkandı. Ardından ilk örnek yüklemesi yapılacağı zaman; 32 Karat bilgisayar yazılımı kullanılarak örneğin iki

boyutlu ayırımı için sistemin izleyeceği yolu içeren bir metod oluşturularak kaydedildi. Gerekli tüm hazırlıklar tamamlandı ve 1. ve 2. boyut kolonları dengelendikten ve örnek hazırlığı tamamlandıktan sonra yazılım üzerinden hazırlanmış olan metod seçilip örnek yükleme işlemi başlatıldı. Kullanılan sistemde 3-4 dakika boyunca tüm bölümlerin otomatik olarak kontrolü yapılmaktadır. Sistem hazır hale geldiğinde örnek yüklemeye izin vermektedir. Bu aşamada örneği içeren 3 mL'lik enjektör yükleme portuna yerleştirildi. Yükleme portu yükleme pozisyonuna getirildikten sonra belirlenen miktarda örnek hiç hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde sisteme yüklendi ve yükleme portu tekrar eski durumuna getirildi. Her biyolojik tekrar için karşılaştırılması yapılacak kontrol ve enfekte örneklerden eşit miktarda örnek yüklenmesine özen gösterildi. Yükleme işlemi bittikten sonra yükleme portu ve iğne tekrar HPLC için uygun su ile yıkanıp temizlendi. Kullanılan sistemde örneğin 1. boyut ayırımı yaklaşık olarak 3.5 saatte (220 dakika) tamamlanmaktadır. Bu süre sonunda sistem otomatik olarak ayrılan her bir fraksiyonun 200 µl'sini 2. boyut ayırımı için HPRP kolonuna transfer etmektedir. İkinci boyut kolonunun en uygun çalışma sıcaklığı 50°C olduğundan dolayı ikinci boyut analizlere geçilmeden önce kolon ısıtıcısı açıldı. Analizler süresince bilgisayar yazılımı üzerinden örneklerin birinci ve ikinci boyut kromatogramları kontrol edildi.

#### **3.4.6. Kromatogram Verilerinin Analizi**

Bitki materyalinden izole edilen proteinlerin PF2D sisteminde iki boyutlu ayırımı tamamlandıktan sonra elde edilen veriler bu sisteme özgü olarak geliştirilen ProteoVue yazılımı tarafından işlenerek sanal jel haritalarına dönüştürüldü. Bunun için bir örneğin 1. boyut ayırımında toplanan fraksiyonların pH aralık değerleri ve bu fraksiyonlardan her birinin 2. boyut ayırımı sırasında elde edilen UV-2 kromatogramları birebir eşleştirildi. Bu şekilde bir örneğe ait II. boyut ayırımı yapılan tüm fraksiyonların protein içeriği sanal jel haritalarında düzenlenerek iki boyutlu jel görüntüsü biçiminde elde edildi.

Farklı örneklere ait protein profillerinin karşılaştırılmasında ise DeltaVue programı kullanıldı. Bunun için programda ProteoVue ile hazırlanmış olan 2 örneğe ait sanal jel haritaları eş zamanlı olarak kontrol örnek sağda enfekte örnek solda olacak şekilde yerleştirildi. Her örneğe ait haritada hem kromatogram hem de sanal jel

görüntüsü birlikte izlendi. Ekranın ortasında da iki profilin üst üste karşılaştırılmış hali incelendi. Daha detaylı karşılaştırma yapabilmek için her iki haritada da aynı pH aralığına sahip fraksiyonlarda bulunan protein profilleri birebir karşılaştırıldı ve UV-2 kromatogramlarında yer alan her bir protein piki birebir eşleştirilip numaralandırıldı. Numaralanan her pik için temel çizgi (baseline) pikin başlangıç ve bitiş noktasına göre düzenlendi. Böylece o pikin temsil ettiği proteinin miktarı, program tarafından pik alanı hesaplanarak belirlendi. Seçilerek numaralanan her pik için pH aralığı, miktarı, eşleştirildiği proteine oranı gibi detaylı bilgiler elde edildi. Sonuç olarak karşılaştırılan iki ayrı örneğe ait tek tek tüm fraksiyonlar ve her fraksiyondaki tek tek tüm proteinler karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Böylelikle anlatım düzeyi farklı olan protein pikleri kolayca gözlenebildi. Daha sonra da anlatım farklarının oranı göz önünde bulundurularak hangi proteinlerin kütle spektrometresinde (MS) analiz edileceği belirlendi.

### **3.5. PROTEİNLERİN TANIMLANMASI**

#### **3.5.1 Kütle Spektrometrik Analizler İçin Örnek Hazırlığı**

PF2D sisteminde iki boyutlu ayırımı yapıldıktan sonra nanoLC-ESI-MS/MS analizi için seçilen fraksiyonlar 1.5 mL'lik LoBind tüplere alındı ve vakumlu konsantratörde (Eppendorf AG Cocentrator Plus 5305) kurutuldu. Kurutulan protein örnekleri daha sonra 10 µL 50 mM amonyum bikarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )'da, tüp karıştırıcıda sık sık karıştırılarak çözündürüldü. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında birkaç saat bırakılarak tamamen çözünmeleri sağlandı. Bunun ardından protein konsantrasyonu nanodrop spektrometrede, 280 nm'de belirlendi. Daha sonra örneklere iki farklı yöntem ile tripsinizasyon uygulandı kütle spektrometrik analizler gerçekleştirildi.

##### *3. 5.1.1. Tripsinizasyon işlemleri*

Seçilmiş olan proteinlere ait fraksiyonların kütle spektrometrik analizler için hazırlanmasında ilk aşama proteinlerin enzimle muamelesi sonucu triptik peptidlere kesilmesidir. Bu amaçla doğrudan tripsinizasyon yöntemi ve çok fazla protein piki içeren fraksiyonlarda ise SDS-PAGE analizi sonrası tripsinizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Doğrudan tripsinizasyon yöntemi için hazırlıkta kullanılan kimyasal ve solüsyonlar Tablo 3.8’de verildi.

Tablo 3.8: Doğrudan tripsinizasyon için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları

Kimyasal/Çözelti Adı	İçeriği	Hazırlanışı
50 mM Amonyum bikarbonat	40 mg amonyum bi karbonat (Fluka, 09830)	Bileşen tartılıp son hacim 10 mL olacak şekilde HPLC için uygun su içerisinde çözüldü.
100 mM DTT	15.5 mg Dithiothreitol (Sigma, 43815), 50 mM amonyum bikarbonat	DTT tartılıp son hacim 1 mL olacak şekilde 50 mM’lık amonyum bikarbonat içerisinde çözüldü.
200 mM İyodoasetamid	56 mg İyodoasetamid (Sigma I1149), 50 mM amonyum bi karbonat	İyodoasetamid tartılıp son hacim 1.5 mL olacak şekilde 50 mM’lık amonyum bikarbonat içerisinde çözüldü.
Tripsin	Tripsin (Sigma, T6567), 50 mM amonyum bikarbonat	1 vial tripsin 1 mL 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde çözüldü.

Örneklere, disülfid bağlarını zayıflatmak için 5.5 µL DTT (100 mM) ilave edildi. Ardından 60°C’de 15 dak inkübe edilip, zayıflatılmış sistein yan zincirlerini modifiye etmek için üzerine 6.1 µL iyodoasetamid (200 mM) eklendikten sonra oda sıcaklığında karanlıkta 30 dak inkübe edildi. Bu işlemin ardından örneklere, enzim:protein oranı 1:50 olacak şekilde tripsin eklendi ve 37°C’de gece boyu inkübe edildi.

Çok sayıda protein varlığı gözlenen fraksiyonlarda SDS-PAGE analizleri sonrası 3. boyut ayırımı yapılmış olan kontrol ve enfekte örneklerin protein bantları karşılaştırılarak farklı anlatım düzeyine sahip olan protein bantları jelden kesilerek MS analizi yapıldı. Bu analizlerin yapılacağı örneklerde, özellikle uygulama hatasından kaynaklanan kontaminasyonlardan (jel yapımı sırasında ve örnek hazırlığında keratin vb. bulaşımı) sakınmak amacıyla Thermo Scientific firmasının ürünü olan gradiyent jeller (%4-%20) (Precise<sup>TM</sup> Protein Gels 25244) kullanıldı.

Thermo Scientific firmasının ürünü olan %4-%20 gradiyent jel sistemi bu jeller için üretilmiş, ticari olarak temin edilen örnek yükleme tamponuna (Precise, 39000) ve elektroforez için de 1x Tris-HEPES tamponuna (Thermo Scientific, 28368) ihtiyaç duymaktadır. PF2D sisteminde ayırımı yapılan ve MS analizi için seçilen 2. Boyut fraksiyonlar vakumlu konsantratörde tamamen kurutulduktan sonra 10 µL 50mM

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$  içinde çözüldürüldü. 4 hacim örnek, 1 hacim 5x örnek yükleme tamponu (Precise reducing tampon, 39000) ile karıştırıldı. Karışım vortekslenip proteinlerin denatüre edilmesi için  $100^\circ\text{C}$ 'de 3 dakika inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra jele yüklendi. Yürütme tamponu olarak 20x Tris-HEPES Tamponu (Thermo Scientific, 28368) 1x olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı. Örnekler 100 V sabit voltajda yaklaşık 1 saat yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra floresans boyama yöntemi kullanılarak protein bantları görüntüledi.

Yürütme işlemi sonrasında jeller Oriole<sup>TM</sup> Floresans Jel Boyama Kiti (Bio-Rad 161-0497) kullanılarak boyandı. Bunun için önce boyama solüsyonu hazırlandı. Kit içeriğinde 590 mL Oriole jel boyama solüsyonu üzerine 400 mL metanol ve 10 mL konsantre boya (oriole fluorescent gel stain concentrate) eklendi ve iyice çalkalandı. Daha sonra jel kasetten çıkartılarak bir kaba alındı ve üzerini örtecek şekilde boyama solüsyonu eklendi. Üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak 90 dakika çalkalayıcıda bekletildi.

Floresan olarak boyanmış olan jel UV ışık altında "DNr MiniBIS Pro Bio-Imaging System" ile görüntüledi ve bant seçimi için fotoğraf çekildi. Görüntülenen jelde anlatım farkı gözlenen bantlar seçilerek UV ışık altında temiz bir asetat üzerinde ve steril bir neşter kullanılarak kesildi. Kesilen jel parçası küçük parçalara ayrıldı ve ependorf tüpe alınarak, tripsinizasyon yapılarına kadar  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Kullanılan kimyasal ve solüsyonlar ile hazırlanışları Tablo 3.9'da verildi.

Tablo 3.9: Jel analizi sonrası tripsinizasyon için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları

Kimyasal/Çözelti Adı	İçeriği	Hazırlanışı
Temizleme çözeltisi	Asetonitril, 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bileşenler 1:1 (v/v) oranında karıştırılır.
10 mM DTT	15.4 mg DTT, 50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	DTT tartılıp son hacmi 10 mL olacak şekilde 50 mM'lık NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> içerisinde çözüldü.
55 mM İyodoasetamid	102 mg İyodoasetamid, 50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	İyodoasetamid tartılıp son hacmi 10 mL olacak şekilde 50 mM'lık NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> içerisinde çözüldü.
100 mM Amonyum bikarbonat	80 mg NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bileşen tartılıp son hacmi 10 mL olacak şekilde HPLC için uygunsu içerisinde çözüldü.
50 mM Amonyum bikarbonat	40 mg NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bileşen tartılıp son hacmi 10 mL olacak şekilde HPLC sınıfı su içerisinde çözüldü.
20 ng / µL tripsin	Tripsin	1 vial tripsin 1 mL 50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> içerisinde çözüldü.
Ekstraksiyon çözeltisi	30 µL %1 (v/v) formik asit, %2 (v/v) asetonitril	Bileşenler tartıldı ve 1 mL ye HPLC için uygun su ile tamamlandı.

Jelden kesilen bantların MS analizler için hazırlanması amacıyla Wilm ve diğ. tarafından belirlenen prosedür kullanıldı (Wilm ve diğ., 1996). Bu amaçla kesilmiş ve mikrotüpe aktarılmış olan jel parçaları üzerine 50 µL temizleme çözeltisi ilave edildi ve 30 dak karıştırıcıda çalkalanarak jeldeki boya uzaklaştırıldı. Daha sonra temizleme çözeltisi pipet ile uzaklaştırılıp jel parçaları üzerine 50 µL asetonitril eklendi. Bu işlem yapıldığında jel parçalarının birbirine yapışıp beyaz renk aldığı görüldü ve asetonitrilin fazlası pipet ile uzaklaştırılıp jel 50°C'de kurutuldu. Jel üzerine 100 µL, 10 mM DTT ilave edilip ve 60°C'de 30 dak inkübe edildi. Ardından tüpe 100 µL, 55 mM iyodoasetamid katılıp ve oda sıcaklığında 20 dak karanlık bir ortamda inkübe edildi, DTT ve iyodoasetamid pipet ile uzaklaştırıldı ve jel parçaları iki defa 500 µL, 50 mM amonyum bikarbonat ile yıkayıp yıkama çözeltileri pipet ile uzaklaştırıldı. Jel parçaları 200 µL asetonitril ile işleme sokuldu. Bu sırada jel parçalarının birbirine yapışarak beyaz renge dönüştüğü gözlemlendi. Asetonitril uzaklaştırıldıktan sonra jel parçaları 200 µL, 50 mM amonyum bikarbonat içinde süspanse edildi. Amonyum bikarbonat uzaklaştırıldı ve asetonitril ve amonyum bikarbonat ile yapılan işlemler 2 kez tekrarlandı. Jel parçaları 200 µL asetonitril ile yıkayıp, asetonitril uzaklaştırıldıktan sonra 50°C'de kısa bir süre kurutuldu ve 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde hazırlanmış 20 ng/µL konsantrasyonundaki tripsin solüsyonundan 25-30 µL (jel yüzeyini kaplayacak kadar) eklendi ve 16-18

saat 37°C’de inkübe edilerek jelde bulunan proteinlerin triptik peptidlere parçalanması sağlandı. Daha sonra elde edilen triptik peptidlerin jelden ekstraksiyonu için 30 µL %1 (v/v) formik asit ve %2 (v/v) asetonitril içeren ekstraksiyon çözeltisi eklenip 30 dak çalkalayıcıda inkübe edildi.

### 3.5.1.2. Triptik Peptidlerin Temizlenmesi ve MS Analizi için Hazırlanması

Tripsinizasyon sonucunda elde edilen triptik peptidler, ZipTip (Millipore, ZTC18M096) adı verilen ve ucunda MicroC18 kolonu bulnan pipet uçlarından geçirilerek (Şekil 3.7) konsantre edilirken tuz ve reaksiyon bileşenlerinden temizlendi. Bu işlem için öncelikle hem doğrudan hem de jelden kesilerek tripsinizasyon işlemi uygulanan örnekler 10-15 saniye düşük hızda santrifüj edildi. Daha sonra bir mikropipet ile ZipTip pipet ucundaki C18 kolonu 3 kere %0.1 (v/v) TFA içeren %70’lik (v/v) asetonitrilde, ardından 5 kez %0.1 (v/v) TFA içeren HPLC için uygun suda pipetaj yapılarak peptidleri bağlayabilir hale getirildi. Ardından 30 kere örnekte pipetaj yapılarak peptidlerin kolona bağlanması sağlandı. Ardından 3 kez %0.1 TFA içeren HPLC için uygun suda pipetaj yapılarak tuzlar uzaklaştırıldı ve son olarak da 30 kez ayrı bir tüp içerisinde bulunan temiz %0.1 (v/v) TFA içeren %70’lik (v/v) asetonitrilde pipetaj yapılarak peptidlerin elüsyonu sağlandı. Bu işlem yapılırken her örnek için bir adet ZipTip pipet ucu kullanıldı.



Şekil 3.7: C18 kolon içeren ZipTip pipet ucu.

ZipTip ile temizlenen örnekler vakumlu konsantratörde kurutulup 5 µl %0.1 (v/v) formik asit içeren HPLC için uygun su içerisinde çözündürüldü. Elde edilen triptik karışıma 1 mL 50 mM amonyum bikarbonat içinde çözündürülmüş internal kalibrant (50 fmol ADH1\_YEAST- Waters MassPrep Enolase Digestion Standart, 186002325) çözeltisinden 0.5 µL eklendi ve 3-5 saniye vortekslenip MS analizi yapılacak cihaz için özel plastik şişelere hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarıldı ve kütle spektrometresine (Waters SNAPT-HDMS) yerleştirildi.



### 3.5.2. Kütle Spektrometrik (nanoLC-ESI-MS/MS) Analizler

Protein tanımlaması yapılacak fraksiyonlar hazırlandıktan sonra TÜBİTAK MAM GMBE’de bulunan Waters HDMS nanoLC-ESI-MS/MS (nanoACQUITY ultra basınçlı likit kromatografi (UPLC) ve SYNAPT Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometri) sisteminde (Şekil 3.8) kütle spektrometrik analize tabi tutuldu. Bu amaçla 2 µL örnek sisteme “nanolockspray iyon kaynağı” ile yüklendi. Örnek enjeksiyonundan önce kolonlar %97 mobil faz A solüsyonu (%0.1 formik asit içeren LC-MS su) ve %3 mobil faz B solüsyonu (%0.1 formik asit içeren asetonitril) ile dengelendi ve kolon sıcaklığı 35°C’ye ayarlandı. İlk olarak peptidler nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap kolonda (5 µm tanecik boyutulu, 180 µm x 20 mm boyunda) 5 µL/dakika akış hızında 5 dakika yürütüldü. Peptidler kolondan gradiyent elüsyonuna göre ayrıldı ve analitik kolonda (nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column, 1,7 µm tanecik boyutlu, 75 µm x 250 mm boyunda) 300 nL/dakika akış hızında %5’den %40’a kadar artan lineer bir asetonitril gradiyenti boyunca 90 dakika yürütüldü.



Şekil 3.8: Waters SYNAPT HDMS kütle spektrometri sistemi

Belirli bir m/z değerindeki bütün peptidlerin parçalanarak tanımlanması için cihaz pozitif iyon V modunda (“Data independent acquisition” Veri bağımsız yakalama modunu sağlamak için) çalıştırılmıştır. MS ve MS/MS fonksiyonları 1.5 saniye

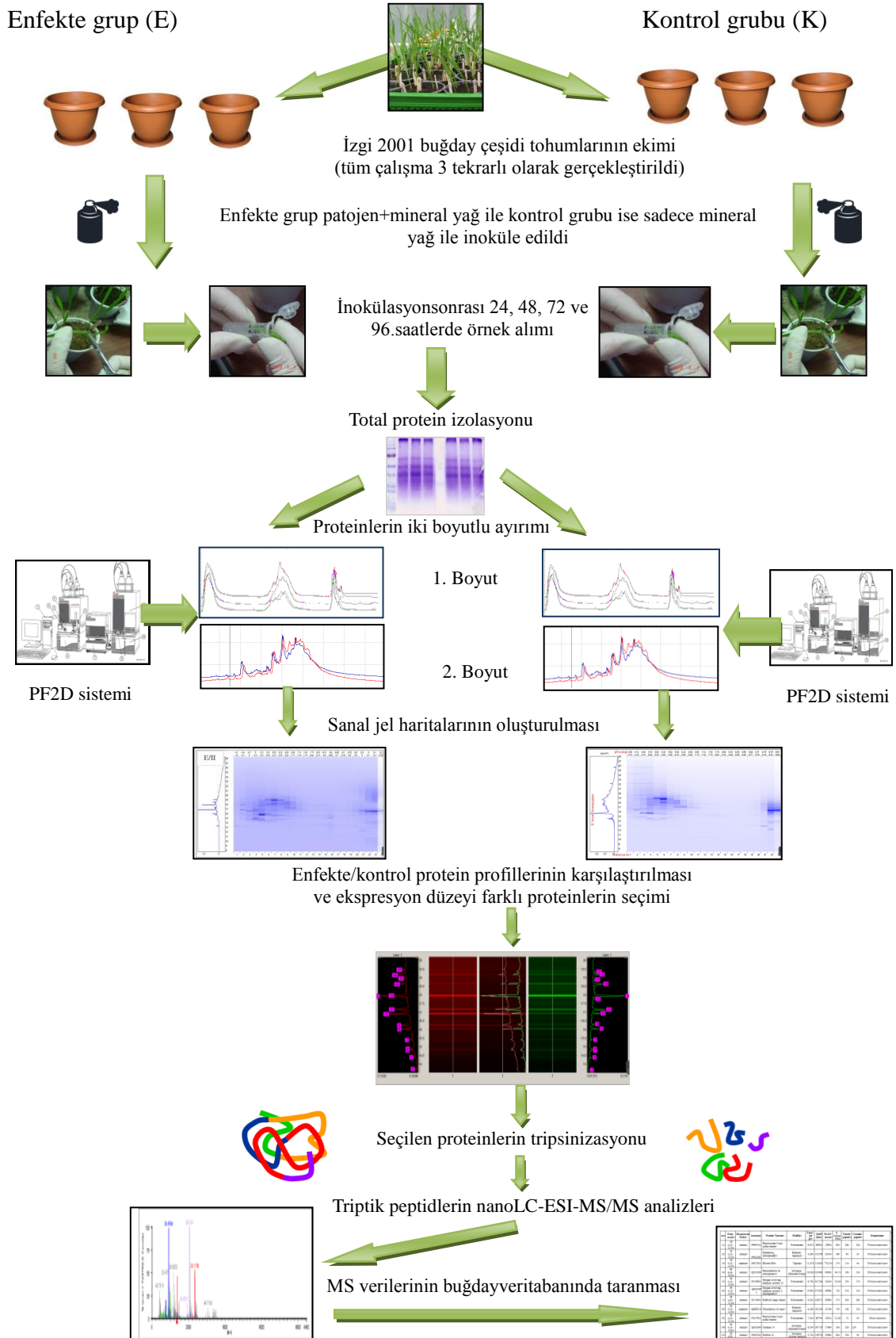
aralıklarla 6 V düşük enerji ve 15-40 V yüksek enerji çarpıştırmaya dayanarak peptid kütle/yük oranı (m/z) ve amino asit sırasını belirlemek için ürün iyon bilgisi kayıt altına alındı. Elde edilen kütle bilgisinin doğruluğunu kontrol amacıyla kalibrant Glu-fibrinopeptid 45 saniyede bir nanolockspray iyon kaynağından 300 nL/dakika akış hızında geçirildi. Bütün bu ayarlar uygulanarak 50-1600 m/z değerleri arasında peptid sinyali alınan veriler kayıt edildi.

### **3.5.3. Verilerin Biyoinformatik Analizi**

Ardışık kütle spektrumu ProteinLynx Global Server V2.4 (PLGS – Waters Corp., Milford, MA) ile işlenmiş ve Uniprot buğday veritabanında IdentityE algoritması ile tarandı. IdentityE, kesim enzimi tripsin varsayılarak ve fragment iyon kütle toleransı 0.028 Da; parent iyon toleransı 0.011 Da olacak şekilde kurgulandı. Apex3D veri hazırlama parametreleri 0.2 dak kromatografik pik genişliği, 10.000 MS TOF rezolüsyonu, 150 sayım düşük enerji eşiği, 50 sayım yüksek enerji eşiği ve yoğunluk eşiği 1200 sayım olacak şekilde ayarlandı. Veritabanı arama sorgusu her peptid için enaz 3 fragment iyonu, her protein için en az 7 fragment iyonu, her protein için en az 1 peptid eşlenmesi ve 1 ıskas kesim eşleşecek şekilde ayarlandı. Karbamidometil-sistein modifikasyonu, asetil N-uç, asparajin ve glutamin deamidasyonu, metiyonin oksidasyonu değişken modifikasyonlar olarak tanımlandı.

#### 4. BULGULAR

Tez çalışmasında sarı pas hastalığına dayanıklı İzgi 2001 çeşidinde sarı pas etmeni *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'ye karşı gelişen dayanıklılık cevabında rol alan proteinler proteomik yöntemlerle belirlenmeye çalışıldı. Patojen sporları ile inoküle edilen (enfekte) ve boş (mock) inokülasyona tabi tutulan (kontrol) buğday bitkilerinden inokülasyonu takiben 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan yaprak örneklerinden total proteinler izole edildi ve Beckman ProteomeLab PF2D sisteminde ile iki boyutlu ayırım ile fraksiyonlandı. Her bir fraksiyondaki protein profilleri enfekte ve kontrol olmak üzere bire bir karşılaştırıldı. Kontrole göre enfekte örneklerde farklı anlatım yaptığı belirlenen proteinler, nanoLC-ESI-MS/MS sistemi ile tanımlandı. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tüm aşamalar Şekil.4.1'de özetlendi.



Şekil 4.1: Tez çalışmasında izlenen tüm aşamaların şematik gösterilişi.

#### **4.1 PROTEİN İZOLASYONU**

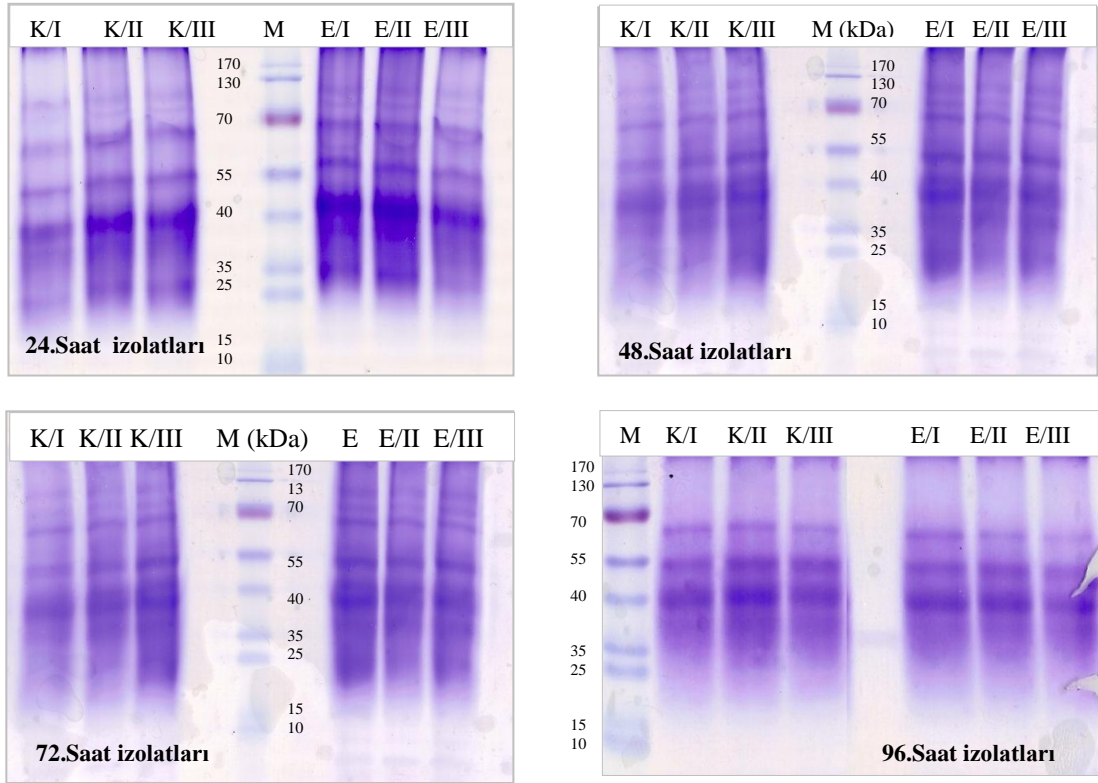
Çalışmanın ilk aşamasında, patojen uygulanmış ve enfeksiyon cevabı geliştirmiş enfekte grubu bitkilerden ve boş inokülasyon yapılmış kontrol bitkilerinden inokülasyonu takiben 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan yaprak örneklerinden total protein izolasyonları gerçekleştirildi. Enfeksiyon cevabı verdiği belirlenmiş (Şekil.3.4) ve -86°C’de saklanmış olan her biyolojik tekrara ait kontrol/enfekte grubu yaprak örneklerinden enfeksiyon cevabı Mc Neal (Mc Neal, ve diğ., 1971) skalasına göre en yüksek şiddette (0-1) gerçekleşen bitkilere ait yaklaşık 3 g taze yaprak dokusu kullanıldı. Bu örneklerden Mg/NP40 yöntemiyle (Kim ve diğ, 2003) total protein izolasyonu yapıldı. Tüm biyolojik tekrarların enfekte ve kontrol gruplarına ait protein izolasyon çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü.

#### **4.2 PROTEİN KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ**

İzolasyon sonucunda izotlardaki protein konsantrasyonu Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde Bradford (Bradford, 1976) yöntemiyle belirlendi ve analizler sonucunda örneklerden 2.5 – 3.1 mg/mL aralığında olacak şekilde total proteinler izole edildi.

#### **4.3. ELEKTROFORETİK ANALİZLER**

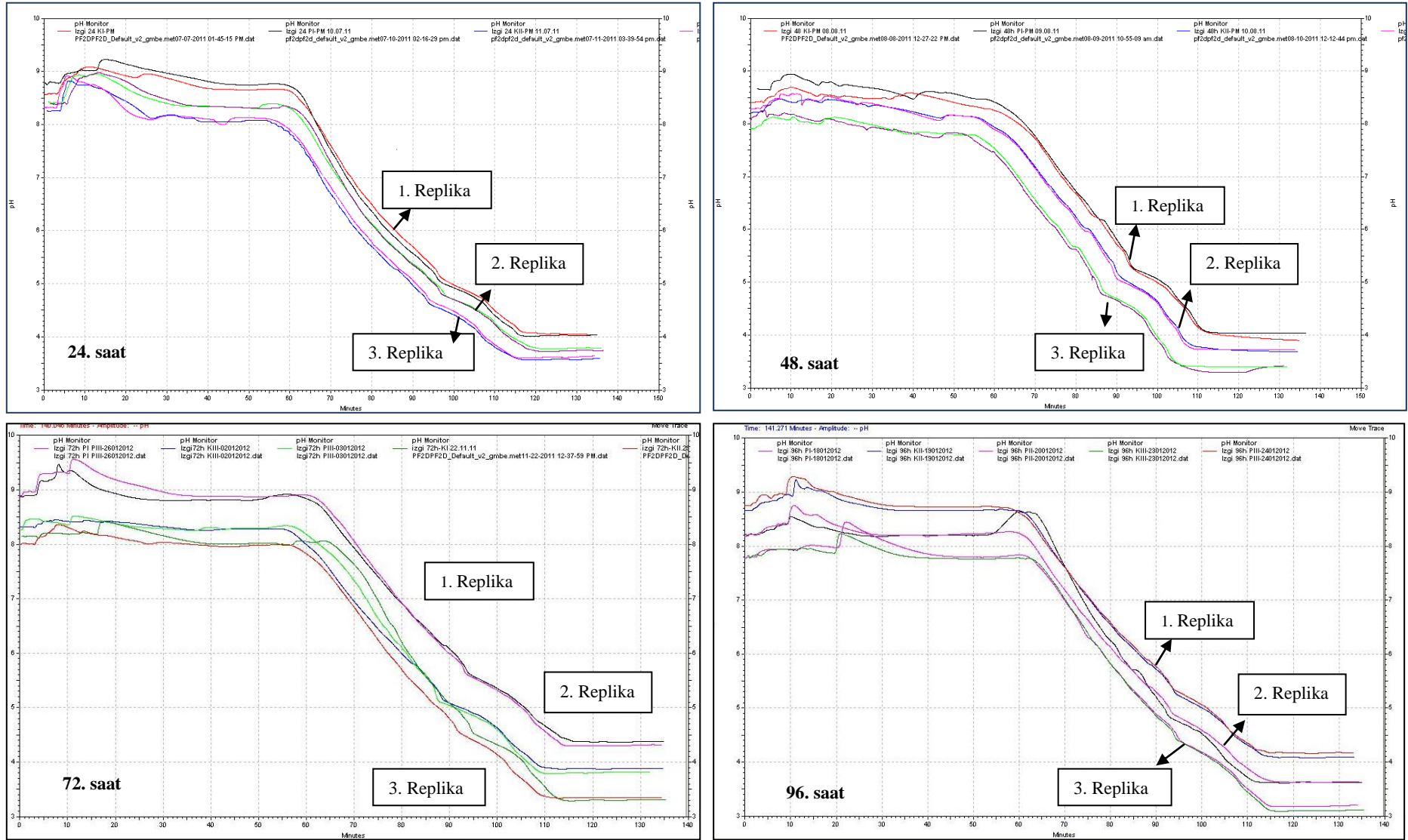
Total protein örneklerinin biyolojik tekrarlar arasındaki uyumu Bölüm 3.3’de anlatıldığı şekilde elektroforetik analizler ile kontrol edildi (Şekil 4.2). Yapılan analizler sonucunda enfekte ve kontrol örneklerin hem kendi zaman dilimine ait örneklerle hem de diğer zaman dilimlerine ait örneklerle karşılaştırıldığında benzer bölgelerde protein bantları verdikleri gözlemlendi.



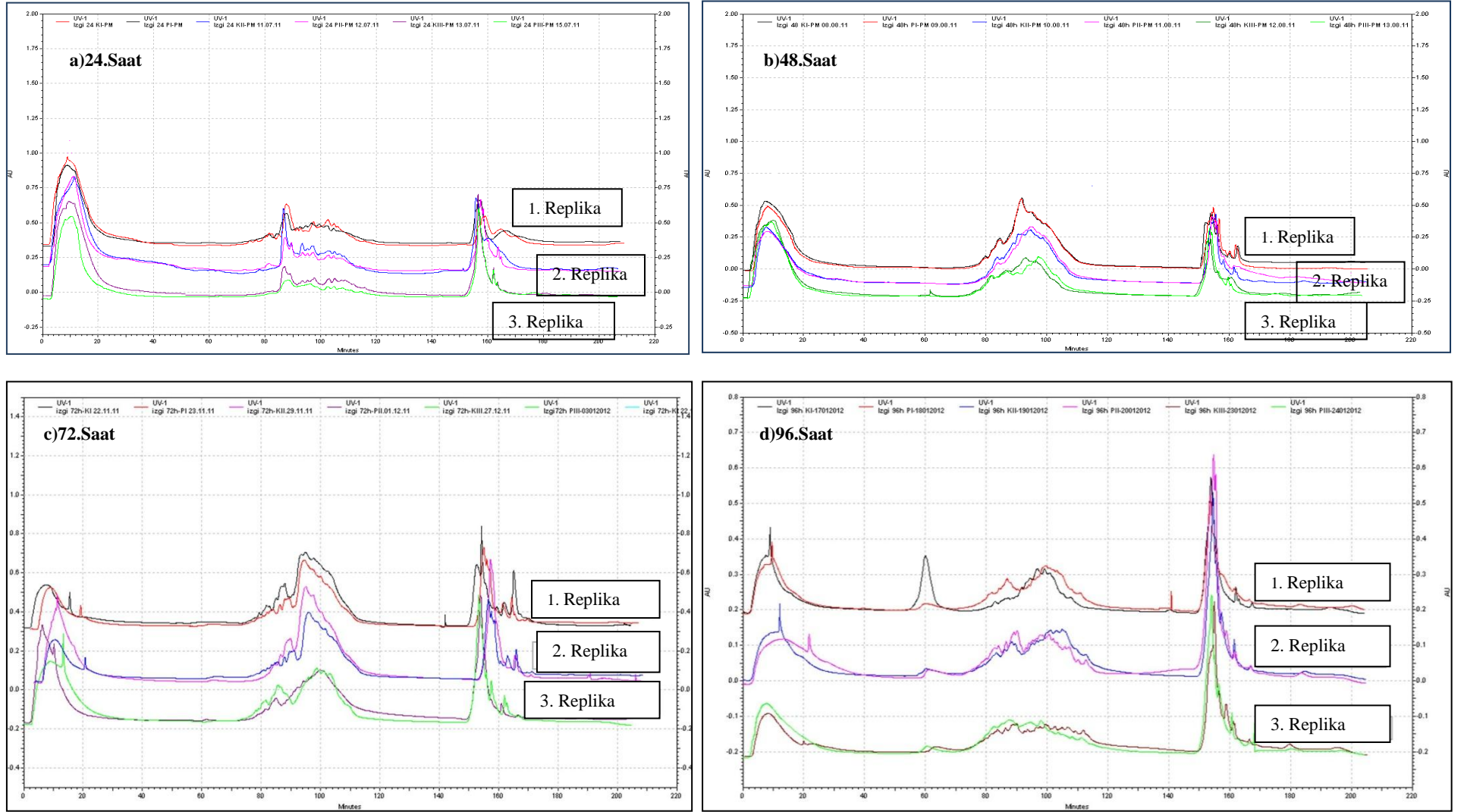
Şekil 4.2: Üç biyolojik tekrarda, kontrol ve enfekte buğday yapraklarından inokülasyonu takiben izole edilen total proteinlerin SDS-PAGE jelindeki bant profilleri (M: Protein belirteci( Fermentas #SM0671) **K/I**: Kontrol / 1. Biyolojik tekrar **K/II**: Kontrol / 2. Biyolojik tekrar **K/III**: Kontrol / 3. Biyolojik tekrar **E/I**: Enfekte / 1. Biyolojik tekrar **E/II**: Enfekte / 2. Biyolojik tekrar **E/III**: Enfekte / 3. Biyolojik tekrar)

#### 4.4 PF2D İLE PROTEİNLERİN 2 BOYUTLU AYIRIMI

Enfekte ve kontrol materyallere ait 3 biyolojik tekrardan izole edilen protein örneklerinin PF2D sisteminde iki boyutlu ayırımı yapıldı. Daha önce yapılan sisteme yüklenecek optimum protein miktarına ilişkin optimizasyon çalışmalarına (Maytalman, 2011) dayanarak 3-3.5 mg protein PF2D sistemine yüklendi. Kontrol ve enfekte örneklere ait biyolojik tekrarlar ardışık olarak kontrol/enfekte örnek olacak şekilde PF2D sisteminde 2 boyutlu olarak ayırıldı. Her 3 tekrarda da hem kontrol hem enfekte örneklerde pH gradiyenti yaklaşık aynı dakikada başladı (60-65 dak) ve aynı hızla devam ederek yaklaşık olarak aynı sürede (110-115 dak.) tamamlandı. Kontrol/enfekte örneklerin 1. boyut ayırımlarında oluşturulan pH gradiyentleri Şekil 4.3'de, 1. boyut kromatogramlarının üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen değerlendirme grafiği Şekil 4.4'de verildi.



Şekil 4.3: Kontrol/enfekte örneklerin 1. boyut ayırımalarında oluşturulan pH gradientleri

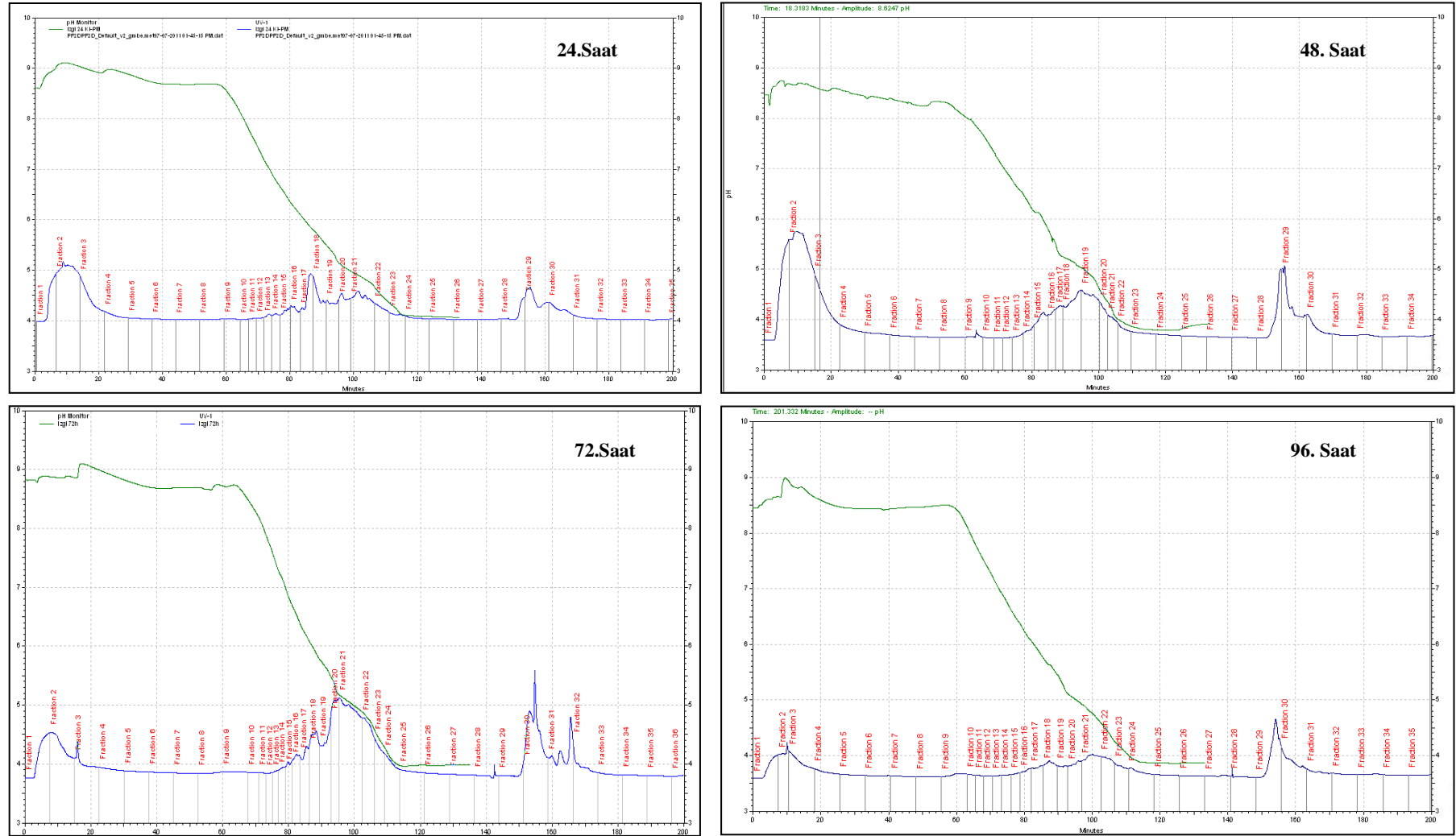


Şekil 4.4: Birinci boyut kromatogramlarının üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen değerlendirme grafiği

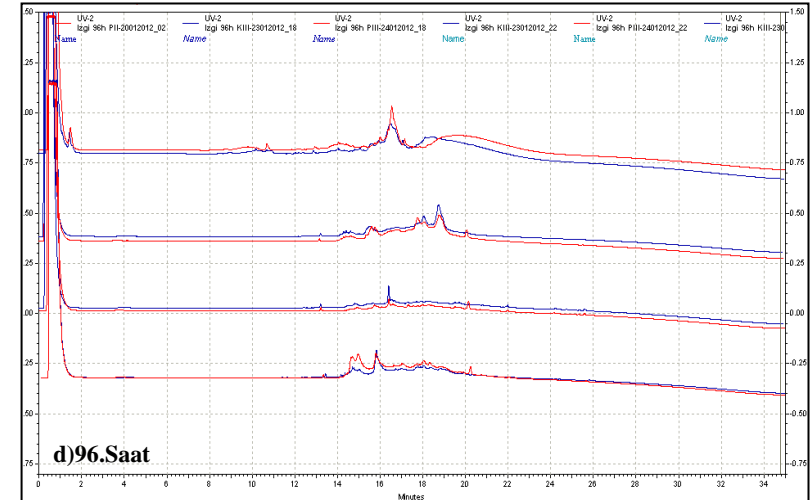
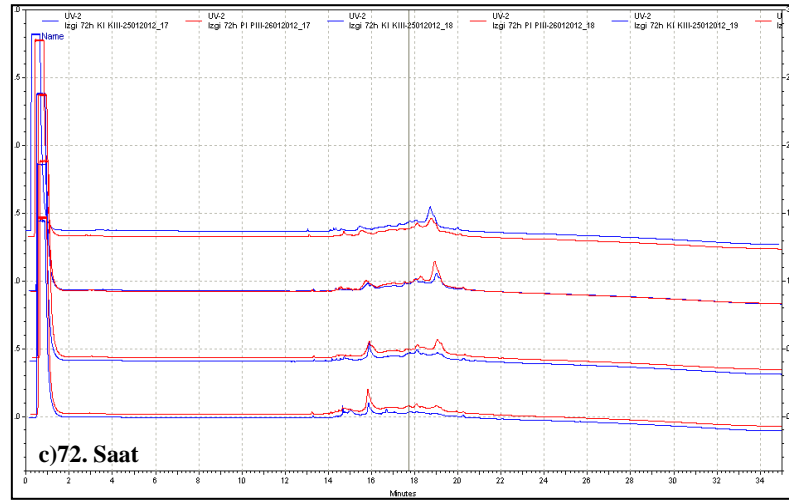
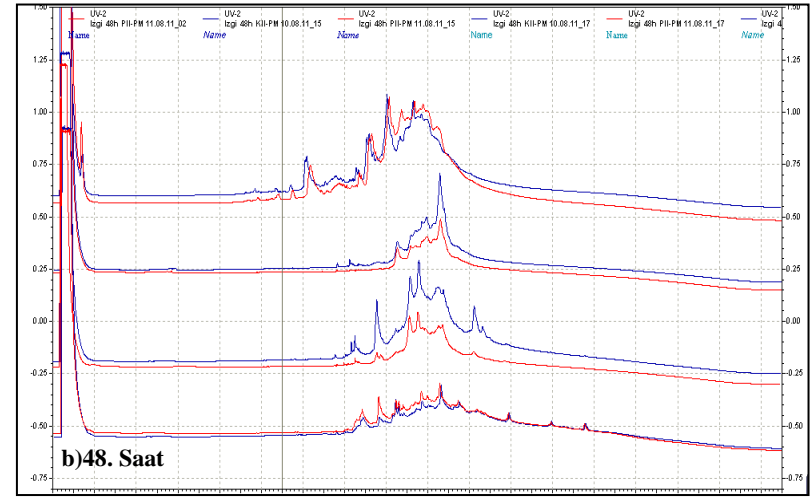
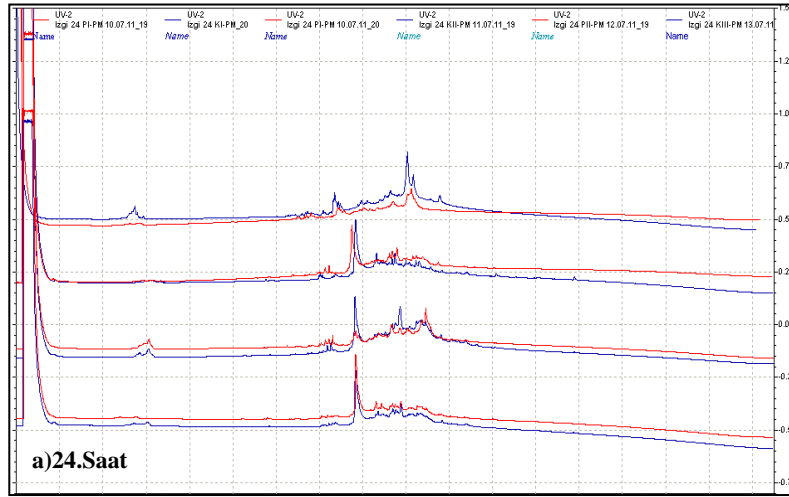


PF2D siteminden elde edilen veriler karşılaştırıldığında kromatogramın her bir tekrar için hem kendi zaman dilimi içinde hem de diğer zaman dilimlerinde benzer bir şekilde olduğu ve yapılan 1. boyut ayırımının tekrarlanabilir biçimde gerçekleştiği ortaya koyuldu.

Tüm örneklerde 1. boyut ayırım sırasında 35 fraksiyon toplandı. Bilgisayar yazılımı üzerinde pH gradiyenti ve 1. boyut UV kromatogram (UV-1) verileri birleştirilerek her fraksiyonun pH aralığı ve en son protein pikinin görüldüğü genel fraksiyon belirlendi. Tüm gruplarda protein varlığının ağırlıklı olarak ilk 30 dakikada pH 8.5 civarında ve daha sonra 75-110 dakikalar arasında pH 7.0-4.0 arasında toplandığı görüldü. 28-30. fraksiyonlarda ise yüksek yoğunluklu tuz çözeltilisinden gelen tuz pikleri gözlemlendi (Şekil 4.5). Bu veriler değerlendirilerek 24. saat ve 48. saat örneklerinde 23, 72. saat ve 96. saat örneklerinde ise ilk 24 fraksiyonun 2. boyut ayırımını gerçekleştirildi. PF2D siteminde yapılan 2. Boyut ayırımın kontrol/enfekte örnekler arasındaki uyum ve farklılıkları, elde edilen 2. boyut UV (UV-2) kromatogramlarının üst üste karşılaştırılmasıyla genel olarak değerlendirildi (Şekil 4.6).



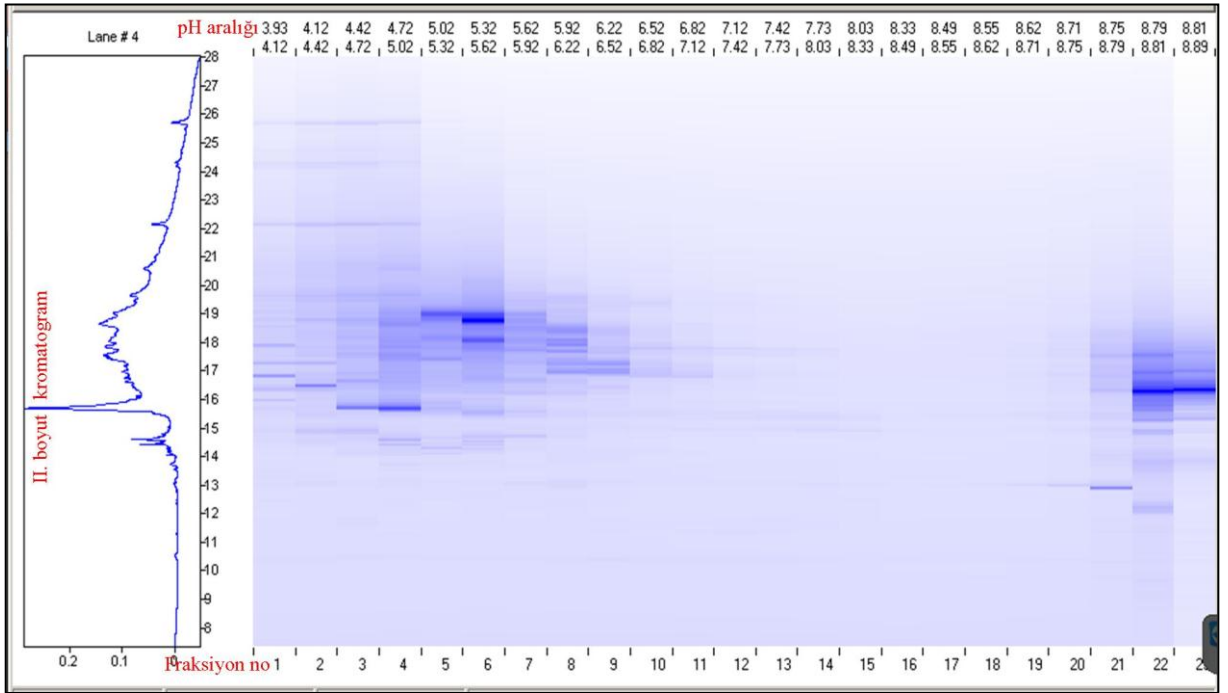
Şekil 4.5: pH ve UV-1 kromatogramlarının çakıştırılması sonucu ikinci boyut ayırımı yapılacak fraksiyonların belirlenmesi



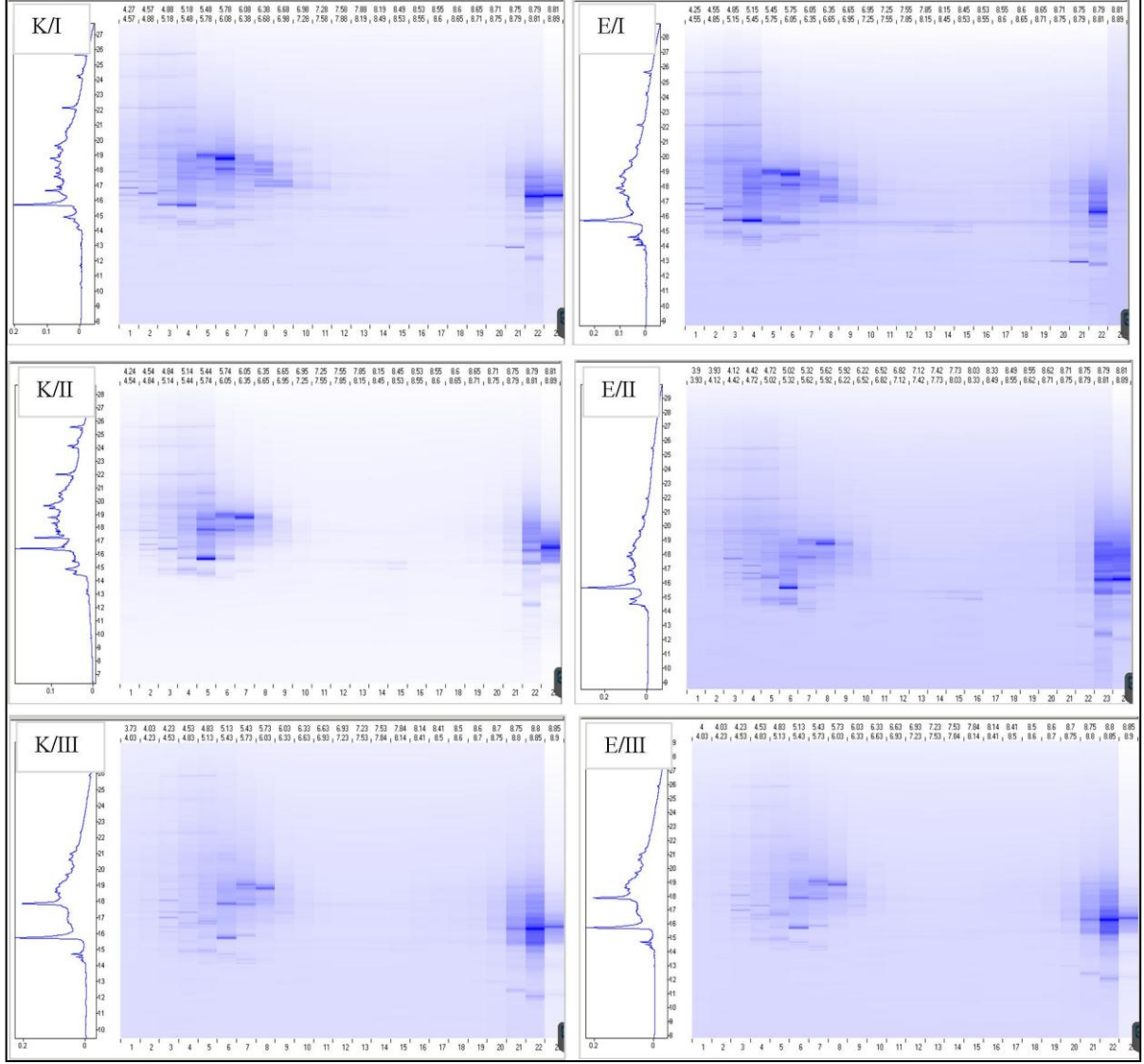
Şekil 4.6: UV-2 kromatogramlarının kontrol/enfekte olacak şekilde çakıştırılarak değerlendirilmesi

#### 4.4.1 Kromatogram Verilerine Dayanarak Sanal Jel Haritalarının Oluşturulması

Birinci ve ikinci boyut ayırımları tamamlandıktan sonra her biyolojik tekrar için sanal jel haritaları ProteoVue yazılımı yardımıyla hazırlandı. ProteoVue yazılımında her örneğin 1. boyut ayırımında toplanan fraksiyonların pH aralık değerleri ile bu fraksiyonlardan her birinin 2. boyut ayırımı sırasında elde edilen UV kromatogramları birebir eşleştirildi. Bu şekilde bir örneğe ait tüm protein içeriği pH aralıkları temel alınarak 2 boyutlu sanal jel haritalarında protein profillerine dönüştürüldü (Şekil 4.7). Yapılan 2 boyutlu ayırımın, biyolojik tekrarlar arasındaki uyumu Şekil 4.8’de gösterildi.



Şekil 4.7: Birinci boyut ve ikinci boyut verileri kullanılarak oluşturulan 2 boyutlu sanal jel haritası.

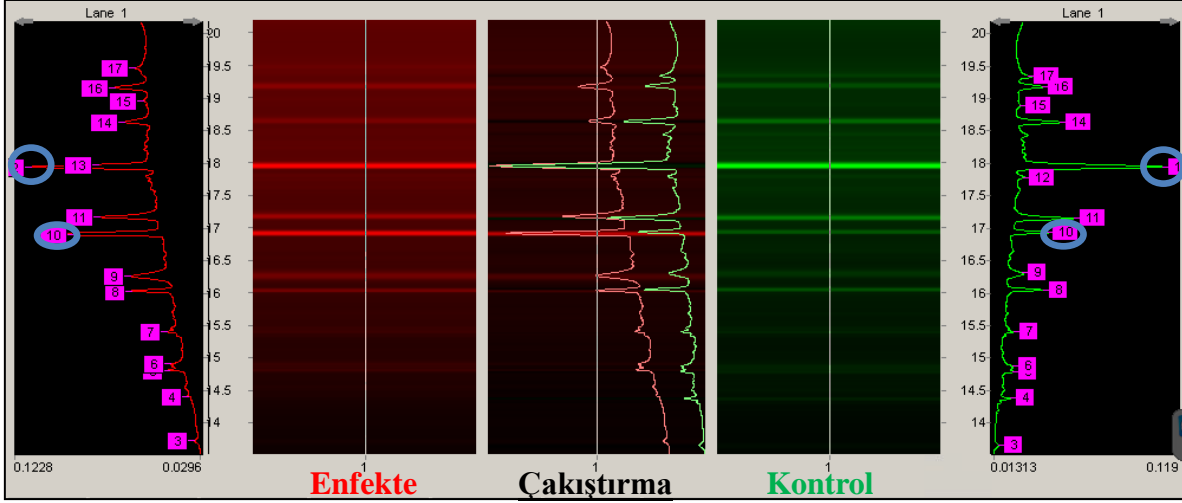


Şekil 4.8: Doksanaltıncı saate ait biyolojik tekrarlar arasındaki 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması. (K: Kontrol, E:Enfekte)

#### 4.4.2 Enfekte ve Kontrol Örneklerinin Karşılaştırılması

ProteVue yazılımı ile her bir örnek için oluşturulan iki boyutlu sanal jel haritaları DeltaVue yazılımı ile kontrol/enfekte olacak şekilde karşılaştırılarak örneklerin protein profilleri karşılaştırıldı. Bu karşılaştırılma sonucunda kontrole göre enfekte örneklerde anlatım düzeyi farklı olan proteinler belirlendi ve tanımlanmak üzere seçildi (Şekil 4.9). Yapılan karşılaştırmalarda her bir kromatogram pikinin bir proteini temsil ettiği varsayıldı (Beckman Coulter PF2D Operator's Manual). Bu karşılaştırmalar, her bir biyolojik tekrar için kontrol/enfekte örneklerinin her bir fraksiyonunda tek tek tüm protein pikleri eşleştirilerek gerçekleştirildi. Karşılaştırmalar sırasında program tarafından her bir protein pikinin alanı tek tek hesaplanarak aralarındaki anlatım farkları ortaya konuldu. Elde edilen veriler

incelendiğinde 24. saat örnekler için 567, 48. saat örnekler için 590, 72. saat örnekler için 627 ve 96. saat örnekler için 646 protein piki karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu eşleştirmelerde her üç biyolojik tekrarda da aynı ekspresyon farkının olduğu pik alanları hesaplanan ve T-testi yapılarak anlamlı olup olmadıkları ( $p < 0.05$ ) belirlendi. Buna göre 24. saat için 33, 48. saat için 24, 72. saat için 34 ve 96. saat için ise 42 pik seçildi ve buldukları fraksiyonlar nanoLC-ESI-MS/MS analizi için Bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde hazırlandı.



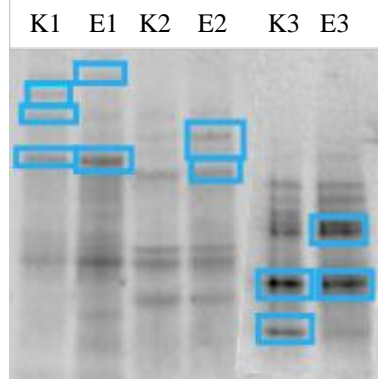
Şekil 4.9: DeltaVue yazılımı ile enfekte/kontrol sanal jel haritaları karşılaştırılarak anlatım düzeyi farklı proteinlerin seçilimi. (İşaretli pikler tanımlanan proteinleri ifade etmektedir)

#### 4.5 PROTEİNLERİN TANIMLANMASI

PF2D sisteminde fraksiyonlanan, sanal jel haritaları düzenlenen ve farklı anlatım düzeyi gösteren proteinleri içeren fraksiyonlar Bölüm 3.5’de anlatıldığı üzere kütle spektrometrik analizler için hazırlandı. Bu aşamalarda elde edilen bulgular Bölüm 4.5.1 ve 4.5.2’de verildi.

##### 4.5.1. Seçilen Piklerin Bulunduğu Fraksiyonlarda SDS-PAGE Analizi

Seçilen pikleri içeren fraksiyonların bir kısmında birden fazla protein varlığı söz konusu olduğundan bu fraksiyonların içeriği tekrar SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 4.10) ve protein miktarında fark görülen bantlar anlatıldığı şekilde hazırlanıp kütle spektrometrik analizlerle tanımlandı.



Şekil 4.10: Birden fazla protein piki içerdiği görülen fraksiyonlarda yapılan SDS-PAGE analizi.  
(K: Kontrol, E: Enfekte örnekleri, numaralar ise pik numarasını temsil etmektedir)

#### 4.5.2. Kütle Spektrometrik Analizler

PF2D sisteminde ayrılan ve enfekte bitkilerde kontrole göre anlatım farklılığı belirlenmiş proteinlerin bulunduğu fraksiyonların kütle spektrometrik analizleri nanoLC-ESI-MS/MS sisteminde yapıldı. nanoLC-ESI-MS/MS'den elde edilen triptik peptitlere ait kütle/yük verileri ve aminoasit dizi bilgisi Uniprot buğday veritabanında eşleştirildi. Yapılan analizler sonucu 24. saat örnekleri için tanımlanan proteinler ve detay bilgileri Tablo 4.1'de, 48. saat örnekleri için tanımlanan proteinler ve bilgileri Tablo 4.2'de, 72. saat örnekleri için tanımlanan proteinler ve bilgileri Tablo 4.3'de, 96. saat örnekleri için tanımlanan proteinler ve bilgileri Tablo 4.4'de verildi.

Tablo 4.1: Yirmidördüncü saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accesion no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
1 4.14-4.44	Artma	P29557	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör E4-1	Gen ekspresyonu	5.26	23975	264.90	45.11	16	5	<i>Triticum aestivum</i>
1 4.14-4.44	Yeni Sentez	Q0V090	RNA polimeraz 2 medyatör	Fungal	4.51	30821	102.01	39.56	34	10	<i>Phaeosphae nodorum</i>
2 4.44-4.74	Azalma	P26302	Fosforibulokinaz	Fotosentez	5.64	45112	1029.2	55.94	29	18	<i>Triticum aestivum</i>
2 4.44-4.74	Artma	Q8LE52	Glutasyon S Transferaz	Savunma	7.81	28495	539.91	10.07	23	2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
2 4.44-4.74	Artma	P52589	Protein disülfid izomeraz (ERp72)	Protein metabolizması	4.80	56498	311.09	43.68	49	18	<i>Triticum aestivum</i>
2 4.44-4.74	Artma	Q03033	Uzama faktörü	Gen ekspresyonu	9.48	49137	59.06	28.63	44	8	<i>Triticum aestivum</i>
2 4.44-4.74	Azalma	P24065	Fotosistem II CP47	Fotosentez	6.06	56056	273.00	19.09	29	6	<i>Triticum aestivum</i>
3 4.74-5.02	Azalma	P12782	Fosfogliserat kinaz	Metabolizma	6.64	49808	237.63	42.29	44	15	<i>Triticum aestivum</i>
3 4.74-5.02	Artma	Q2QKB4	Kırılma faktörü U2af büyük ünite	Gen ekspresyonu	7.52	60549	98.94	33.14	60	13	<i>Triticum aestivum</i>
3 4.74-5.02	Artma	Q9S7U0	İnositol 3 fosfat sentaz	Metabolizma	5.23	56258	116.50	17.64	37	6	<i>Triticum aestivum</i>
3 4.74-5.02	Yeni Sentez	Q4I7N9	E3 ubiquitin protein ligaz BRE1	Fungal	6.99	80160	78.58	31.72	67	23	<i>Fusarium graminearum</i>
3 4.74-5.02	Yeni Sentez	O64392	Patojenez ilişkili protein 4 (PR4, Wheatwin 1)	Savunma	7.57	15624	168.88	62.32	8	4	<i>Triticum aestivum</i>



Tablo 4.1'in Devamı: Yirmidördüncü saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accesion no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
4 5.02-5.32	Artma	P62785	Histon H4	Yapısal	11.87	11402	778.51	27.84	11	2	<i>Triticum aestivum</i>
4 5.02-5.32	Azalma	P00871	RuBisCo küçük zincir	Fotosentez	8.26	13046	9817.8	67.94	17	15	<i>Triticum aestivum</i>
5 5.32-5.62	Artma	P38076	Sistein sentaz	Metabolizma	5.29	34092	153.98	24.30	28	6	<i>Triticum aestivum</i>
5 5.32-5.62	Artma	Q9ZP21	Tiyoredoksin M tipi	Elektron transport	8.28	19119	510.49	46.85	18	8	<i>Triticum aestivum</i>
5 5.32-5.62	Artma	Q43199	Adenin fosforibozil transferaz	Metabolizma	4.83	19651	150.97	32.59	13	3	<i>Triticum aestivum</i>
5 5.32-5.62	Artma	Q9LSY1	SKP1 benzeri protein	Protein metabolizması	4.63	17481	656.07	27.63	12	3	<i>Arabidopsis thaliana</i>
5 5.32-5.62	Yeni Sentez	Q0UNW1	Ubikitin-benzeri protein (ATG12)	Fungal	5.19	14040	127.95	31.53	7	2	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
5 5.32-5.62	Azalma	P12463	Fotosistem Q B protein	Fotosentez	5.06	38895	158.00	11.89	14	3	<i>Triticum aestivum</i>
6 5.62-5.92	Azalma	Q00434	Oksijen etkinliğini artırıcı 2	Fotosentez	9.00	27252	3349.2	36.04	21	8	<i>Triticum aestivum</i>
6 5.62-5.92	Azalma	P69415	Fotosistem I demir sülfür merkezi	Fotosentez	6.67	8893	1111.2	43.20	7	3	<i>Triticum aestivum</i>
6 5.62-5.92	Artma	P69443	ATP sentaz epsilon zinciri	Metabolizma	5.01	15208	653.12	41.60	10	6	<i>Triticum aestivum</i>
6 5.62-5.92	Yeni Sentez	Q6TCF2	Aktin	Fungal	5.33	41580	846.68	22.13	34	8	<i>Gaeumanno. graminis</i>
6 5.62-5.92	Azalma	Q7X9A6	Sitokrom b6 f kompleks demir sülfür	Elektron transport	8.17	23711	3626.5	58.10	19	9	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.1'in Devamı: Yirmidördüncü saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accesion no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
7 5.92-6.22	Artma	Q94F73	Patojenез ilişkili protein 1 (PR1)	Savunma	6.88	17537	98.32	51.78	12	6	<i>Triticum aestivum</i>
8 6.22-6.52	Azalma	P11383	RuBisCo büyük zincir	Fotosentez	6.22	52817	95.93	13.20	42	5	<i>Triticum aestivum</i>
8 6.22-6.52	Artma	P02275	Histon H2A	Yapısal	11.10	15576	60.85	16.43	9	2	<i>Triticum aestivum</i>
8 6.22-6.52	Artma	Q5S1S6	Peroksiredoksin Q (Kloroplastik)	Savunma	10.02	23349	769.44	41.01	19	6	<i>Triticum aestivum</i>
8 6.22-6.52	Yeni Sentez	Q0V6R0	Ubikinon biyosentez protein	Fungal	8.63	33101	120.49	26.89	31	5	<i>Phaeosphae. nodorum</i>
8 6.22-6.52	Artma	Q95H54	50S ribozomal protein	Gen ekspresyonu	12.49	14296	162.06	30.,25	9	4	<i>Triticum aestivum</i>
11 7.12-7.42	Yeni Sentez	Q4I7K4	ATP bağımlı RNA helikaz	Fungal	8.33	71491	80.93	27.11	61	13	<i>Fusarium graminearum</i>
23 8.85-9.02	Azalma	P27665	Oksijen etkinliğini artırıcı 1	Fotosentez	8.79	34718	1778.9	29.84	25	10	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.2: Kırksekizinci saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
1 3,87-3,97	Azalma	P62785	Histon H4	Yapısal	11.87	11402	3439	27	11	5	<i>Triticum aestivum</i>
2 3,97-4,27	Artma	P27665	Oksijen etkinliğini artırıcı 1	Fotosentez	8.79	34718	5037	48	25	16	<i>Triticum aestivum</i>
2 3,97-4,27	Artma	P11383	RuBisCo büyük zincir	Fotosentez	6.22	52817	413	36	42	16	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Yeni Sentez	P00228	Ferredoksin (kloroplastik)	Elektron taşınımı	4.36	15276	575	56.6	9	4	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Artma	Q9ZP21	Tiyoredoksin M tip	Elektron taşınımı	8.28	19119	614	74.8	18	12	<i>Triticum aestivum</i>
2 3,97-4,27	Yeni Sentez	P04464	Kalmodulin	Savunma	3.89	16835	313	47.6	23	7	<i>Triticum aestivum</i>
2 3,97-4,27	Artma	A6XMY9	S adenoilmetiyonin sentaz 1	Metabolizma	5.53	42790	681	60.9	32	18	<i>Triticum monococcum</i>
2 3,97-4,27	Artma	P29557	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör E4-1	Gen ekspresyonu	5.26	23975	130	33.9	16	5	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Artma	Q00434	Oksijen etkinliğini artırıcı 2	Fotosentez	9.00	27252	214.9	40	21	9	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Artma	P69415	Fotosistem I demir sülfür merkezi	Fotosentez	6.67	8893	4399	62	7	4	<i>Triticum aestivum</i>
4 4,57-4,87	Yeni Sentez	Q0U6H9	Mitokondriyal iç membran proteaz ATP23	Fungal	6.41	28213	230	37.5	25	8	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
4 4,57-4,87	Azalma	P69443	ATP sentaz epsilon zincir	Metabolizma	5.01	15208	1060	71.5	10	8	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.2'nin Devamı: Kırksekizinci saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
4 4,57-4,87	Artma	P80602	Cys peroksiredoksin BAS1	Savunma	5.6	23312	1363	60.9	18	11	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,17-5,47	Yeni Sentez	Q43206	Katalaz 1	Savunma	6.54	56772	558	47	32	18	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,17-5,47	Artma	B0LXM0	S adenozilmetiyonin sentaz	Metabolizma	5.46	43152	508	50	33	12	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,17-5,47	Artma	P49232	Profilin 1	Savunma	4.72	14972	441	78.9	10	6	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Artma	P26302	Fosforibulokinaz	Fotosentez	5.64	45112	1996	60	29	24	<i>Triticum aestivum</i>
12 6,98-7,28	Yeni Sentez	Q0USF2	Tip 1 fosfataz regülatör YPI1	Fungal	9.91	18247	244.6	42	14	7	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
13 7,28-7,58	Artma	Q03968	Geç embriyogenez baskın protein grup 3	Savunma	9.37	23224	143	52.6	32	12	<i>Triticum aestivum</i>
16 8,18-8,48	Artma	Q7X9A6	Sitokrom b6 f kompleks demir sülfür	Elektron transport	8.17	23711	1680	47	19	8	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Artma	P05151	Apositokrom	Elektron transport	9.07	35340	238,9	24	28	6	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Artma	P26667	RuBisCo küçük zincir PW9	Fotosentez	8.26	19441	172	34.8	17	4	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Artma	Q8LRM8	Translasyonel kontrollü tümör protein homolog	Metabolizma	4.35	18794	1957	78	20	9	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,27-4,57	Artma	P46285	Sedoheptuloz 1 7 bifosfataz	Metabolizma	6	42034	234.7	31	29	10	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.3: Yetmişikinci saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
1 4,25-4,55	Artma	P69415	Fotosistem 1 demir sülfür merkezi	Fotosentez	6.67	8893	1800	63	28	22	<i>Triticum aestivum</i>
1 4,25-4,55	Artma	P00228	Ferredoksin (kloroplastik)	Elektron transport	4.36	15276	2354	56	9	3	<i>Triticum aestivum</i>
1 4,25-4,55	Azalma	P62785	Histon H4	Yapısal	11.87	11402	778.51	27	11	4	<i>Triticum aestivum</i>
9 6.65-6,95	Artma	Q5S1S6	Peroksiredoksin Q (Kloroplastik)	Savunma	10.02	23349	6462	44.7	19	13	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,55-4,85	Artma	P27665	Oksijen etkinliğini artırıcı 1	Fotosentez	8.79	34718	3243	52.9	25	17	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,55-4,85	Artma	Q00434	Oksijen etkinliğini artırıcı 2	Fotosentez	9.00	27252	4098	72	21	15	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,85-5,15	Artma	P11383	RuBisCo büyük zincir	Fotosentez	6.22	52817	3060	57	42	28	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,55-4,85	Azalma	Q9ZP21	Tiyoredoksin M tip	Elektron transportu	8.28	19119	3379	74	18	13	<i>Triticum aestivum</i>
1 4,25-4,55	Artma	P10793	Fotosistem 1 demir sülfür merkezi	Fotosentez	7.45	8974	1631	51.8	7	4	<i>Pisum sativum</i>
2 4,55-4,85	Artma	Q43206	Katalaz 1	Savunma	6.54	56772	5786	50	32	23	<i>Triticum aestivum</i>
3 4,85-5,15	Artma	P49232	Profilin 1	Savunma	4.72	14972	2368	84	10	9	<i>Triticum aestivum</i>
1 4,25-4,55	Azalma	A6XMY9	S adenozilmetiyonin sentaz 1	Metabolizma	5.53	42790	473	59	32	15	<i>Triticum monococcum</i>
2 4,55-4,85	Artma	P05151	Apositokrom	Elektron transportu	9.07	35340	445	55	28	14	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,75-6,05	Artma	P26302	Fosforibulokinaz	Fotosentez	5.4	45112	7225	76.9	29	29	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.3'ün Devamı: Yetmişikinci saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
6 5,75-6,05	Azalma	P80602	Cys peroksiredoksin BAS1	Savunma	5.6	23312	2361	65	18	14	<i>Triticum aestivum</i>
1 4,25-4,55	Artma	P52589	Protein disulfid izomeraz	Protein metabolizması	4.8	56498	287.9	58	49	21	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,75-6,05	Yeni Sentez	Q4HVX7	Sitokrom c	Fungal	9.6	12095	227	36	14	7	<i>Gibberella zeae</i>
2 4,55-4,85	Artma	Q36814	Fotosistem II D2 protein	Fotosentez	5.2	39444	112	16	15	4	<i>Triticum aestivum</i>
5 5,45-5,75	Azalma	P12782	Fosfogliserat kinaz	Metabolizma	6.64	49808	206	37.9	44	11	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,55-4,85	Yeni Sentez	P27357	Taumatın benzeri protein (PR5)	Savunma	4.44	17593	486.9	21	4	1	<i>Triticum aestivum</i>
8 6,35-6,65	Azalma	B0LXM0	S adenzilmetiyonin sentaz	Metabolizma	5.46	43152	182	25.7	33	7	<i>Triticum aestivum</i>
7 6,05-6,36	Azalma	Q7X9A6	Sitokrom b6 f kompleks demir sülfür	Elektron transport	8.17	23711	15938	53	19	17	<i>Triticum aestivum</i>
5 5,45-5,75	Yeni Sentez	Q0UPV4	DNA replikasyon kompleksi GINS protein PSF3	Fungal	5.07	19669	220	12	13	2	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
5 5,45-5,75	Artma	P09195	Fruktoz 1 6 bifosfat (kloroplastik)	Metabolizma	4.95	44189	158	36	22	11	<i>Triticum aestivum</i>
7 6,05-6,35	Azalma	Q8LK61	NADP bağımlı gliser aldehit 3 fosfat dehidrojenaz	Metabolizma	6.39	53013	937	71	38	26	<i>Triticum aestivum</i>
7 6,05-6,35	Artma	P26667	RuBisCo küçük zincir PW9	Fotosentez	8.26	19441	356	70.8	17	10	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.3'ün Devamı: Yetmişikinci saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
7 6,05-6,35	Azalma	Q1W374	Fosfomannomutaz	Metabolizma	5.45	28234	117	32	27	6	<i>Triticum aestivum</i>
7 6,05-6,35	Artma	Q05855	Peroksidaz	Savunma	8.01	32361	264	28	22	8	<i>Triticum aestivum</i>
8 6,35-6,65	Artma	P55313	Katalaz 2	Savunma	6.60	56444	731	38.6	35	15	<i>Triticum aestivum</i>
8 6,35-6,65	Azalma	Q03968	Geç embriyogenez baskın protein grup 3	Savunma	9.37	23224	157	41	32	8	<i>Triticum aestivum</i>
8 6,35-6,65	Artma	P07398	RuBisCo küçük alt birim klon 512	Fotosentez	5.72	13046	308	54.8	11	5	<i>Triticum aestivum</i>
10 6,95-7,25	Artma	P46524	Dehidrin	Savunma	5.02	28166	1072	27	23	4	<i>Triticum aestivum</i>
21 > 8,5	Azalma	Q8L803	50S ribozomal protein L9 (kloroplastik)	Gen ekspresyonu	10.27	21568	169	39	19	7	<i>Triticum aestivum</i>
8 6,35-6,65	Artma	P15984	Peroksidaz fragment	Savunma	4.12	8361	441	32.5	8	2	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.4: Doksanaltıncı saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
7 5,91-6,21	Artma	P11383	RuBisCo büyük zincir	Fotosentez	6.22	52817	801.5	47.16	42	21	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	P26667	RuBisCo küçük zincir PW9	Fotosentez	8.26	19441	2021.7	73.14	17	15	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	P07398	RuBisCo küçük alt brim klon 512	Fotosentez	5.72	13046	2411.36	69	11	9	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	P00871	RuBisCo küçük zincir PWS4 3	Fotosentez	8.94	19404	1846.42	63.21	18	12	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,42-4,72	Artma	P20858	ATP sentaz alfa alt ünitesi (kloroplastik)	Metabolizma	4.87	53823	422.18	30.72	36	10	<i>Triticum aestivum</i>
8 6,21-6,51	Artma	Q5S1S6	Peroksiredoksin Q (Kloroplastik)	Savunma	10.02	23349	2299.19	43.31	19	10	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	P10793	Fotosistem 1 demir sülfür merkezi	Fotosentez	7.45	8974	12973.3	64.19	7	6	<i>Pisum sativum</i>
1 4,1-4,42	Artma	P00228	Ferredoksin (kloroplastik)	Elektron transportu	4.36	15276	2740	49.65	9	4	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,42-4,72	Artma	P27665	Oksijen etkinliğini artırıcı 1	Fotosentez	8.79	34718	709.11	41.53	25	13	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,42-4,72	Artma	Q9ZP21	Tiyoredoksin M tip	Elektron transportu	8.28	19119	3026.11	42.82	18	10	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,42-4,72	Artma	Q00434	Oksijen etkinliğini artırıcı 2	Fotosentez	9.00	27252	544.86	64.72	21	17	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,42-4,72	Azalma	A6XMY9	S adenoziimetiyonin sentaz 1	Metabolizma	5.53	42790	227.6	37.81	32	9	<i>Triticum monococcum</i>
2 4,42-4,72	Artma	Q8L803	50S ribozomal protein L9 (kloroplastik)	Gen Ekspresyonu	10.27	21568	190.96	34.55	19	6	<i>Triticum aestivum</i>



Tablo 4.4'ün Devamı: Doksanaltıncı saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
9 6,51-6,81	Artma	Q43206	Katalaz 1	Savunma	6.54	56772	1527.93	47.76	32	19	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,42-4,72	Artma	Q8LRM8	Translasyonel kontrollü tümör protein homolog	Metabolizma	4.35	18794	3869.79	39.88	20	6	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Artma	P26302	Fosforibulokinaz	Fotosentez	5.64	45112	13469	70	29	30	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Artma	P69443	ATP sentaz epsilon zinciri	Metabolizma	5.01	15208	1792	57.66	10	6	<i>Triticum aestivum</i>
7 5,91-6,21	Azalma	P80602	Cys peroksiredoksin BAS1	Savunma	5.6	23312	485.2	55.23	18	8	<i>Triticum aestivum</i>
2 4,42-4,72	Yeni Sentez	Q4I5V3	Polycomb artırıcı benzeri protein 1	Fungal	5.74	72656	209.37	16.77	45	5	<i>Gibberella zeae</i>
2 4,42-4,72	Artma	Q43199	Adenin fosforibozil transferaz	Metabolizma	4.83	19651	154.09	44.75	13	5	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Artma	P12782	Fosfogliserat kinaz	Metabolizma	6.64	49808	481.76	18.3	44	8	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Azalma	P12112	ATP sentaz beta alt ünitesi (kloroplastik)	Metabolizma	6..06	55261	1021.49	37.55	36	11	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Artma	P25866	Ubikitin konjuge enzim E2	Protein metabolizması	5.54	17290	227.9	39	7	3	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Azalma	P30110	Glutasyon S transferaz 1	Savunma	5.13	25811	451.9	27.9	22	10	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Azalma	P38076	Sistein sentaz	Metabolizma	5.29	34092	179.76	14.46	28	3	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Azalma	P09195	Fruktoz 1 6 bifosfaz (kloroplastik)	Metabolizma	4.95	44189	120.2	29	22	10	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.4'ün Devamı: Doksanaltıncı saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

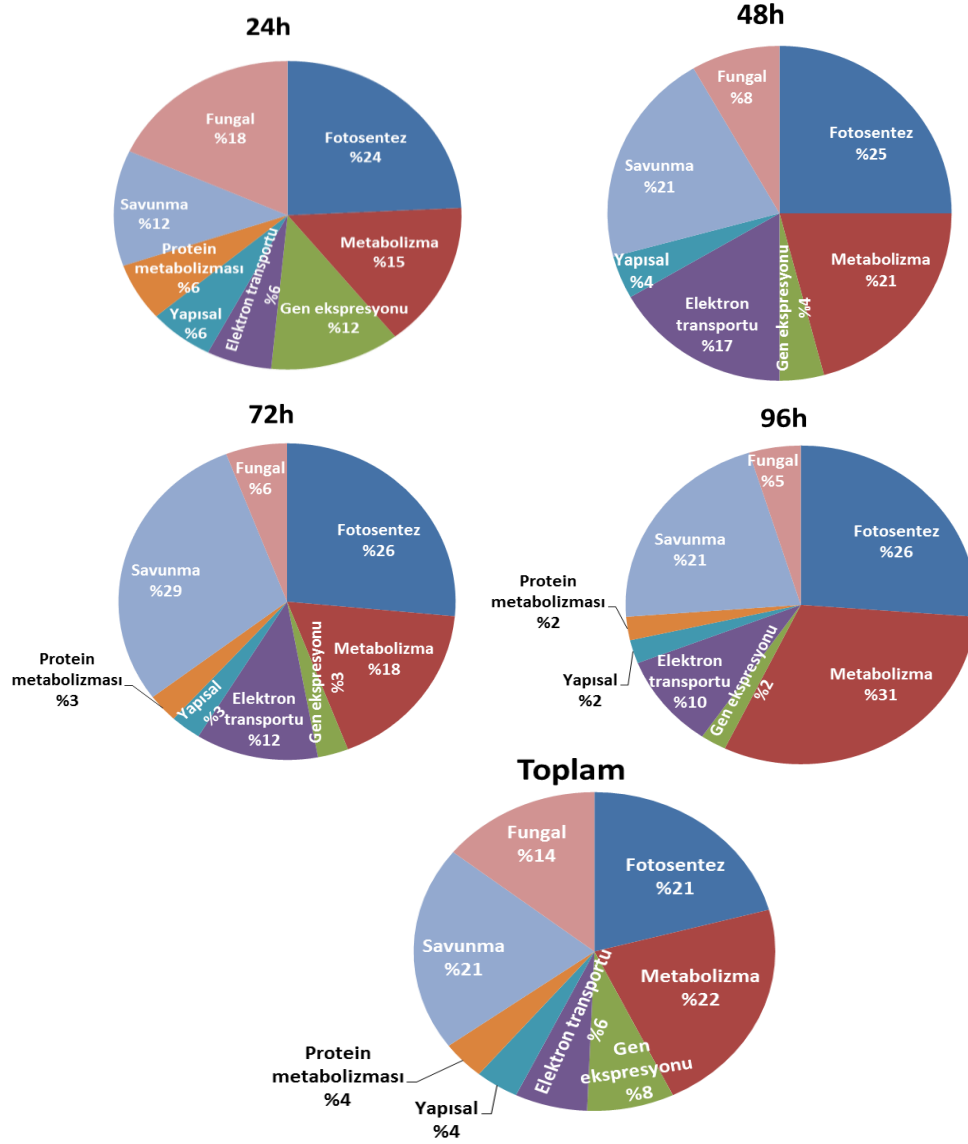
Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
6 5,6-5,91	Azalma	P04784	Klorofil a b bağlanan protein (kloroplastik)	Fotosentez	5.57	28246	2490	21.05	13	3	<i>Triticum aestivum</i>
6 5,6-5,91	Azalma	P05151	Apositokrom	Elektron transportu	9.07	35340	2105.5	66.8	28	16	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	P69415	Fotosistem 1 demir sülfür merkezi	Fotosentez	6.67	8893	12973	64.19	7	6	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	P12298	Glukoz 1 fosfat adenil transferaz büyük ünite	Metabolizma	5.69	33408	158.04	13.2	36	3	<i>Triticum aestivum</i>
7 5,91-6,21	Azalma	BOLXM0	S adenoilmetiyonin sentaz	Metabolizma	5.46	43152	610.35	57.3	33	15	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	P27357	Taumatın benzeri protein (PR5)	Savunma	4.44	17593	248.6	41.96	4	2	<i>Triticum aestivum</i>
7 5,91-6,21	Azalma	P60162	Sitokrom b6	Elektron transport	9.02	24166	754.1	59	19	12	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Azalma	P83970	Plazma membran ATPaz	Metabolizma	6.37	104618	206.1	7.25	68	7	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Yeni Sentez	Q4HVS2	Glukoz N asetil transferaz 1	Fungal	4.08	50152	158	13.22	36	3	<i>Gibberella zeae</i>
9 6,51-6,81	Azalma	P25414	RuBisCo Büyük Zincir	Fotosentez	6.45	46928	1382.8	45.8	35	23	<i>Aegilops tauschii</i>
9 6,51-6,81	Azalma	P40621	HMG1 2 benzeri protein	Yapısal	7.24	17203	151.28	21.7	13	5	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Azalma	P24846	Dihidrodişikolinat sentaz 1	Metabolizma	7.02	42386	144.4	30,9	28	8	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	Q05855	Peroksidaz	Savunma	8.01	32361	597.74	60	22	10	<i>Triticum aestivum</i>

Tablo 4.4'ün Devamı: Doksanaltıncı saat örneklerinin kütle spektrometrik analizi sonucu Uniprot veritabanından tanımlanan proteinler

Frak. no/pI	Ekspresyon Farkı	Accession no	Protein Tanımı	Fonksiyon	Teorik pI	MA (Da)	PLGS skoru	Eşleşen aa dizi (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
9 6,51-6,81	Artma	O04437	Glutasyon S transferaz	Savunma	6.05	23737	232.6	34.7	14	5	<i>Triticum aestivum</i>
9 6,51-6,81	Artma	P55313	Katalaz 2	Savunma	6.60	56444	261.18	30.8	32	11	<i>Triticum aestivum</i>
> 8,5	Azalma	Q03968	Geç embriyogenez baskın protein grup 3	Savunma	9.37	23224	706	9.8	32	2	<i>Triticum aestivum</i>

Frak. No/pI : Fraksiyon numarası / İzoelektrik noktası. Accession no: Uniprot veritabanında proteinin karşılık geldiği kod. MA (Da): Dalton cinsinden Moleküler ağırlık.  
PLGS Skoru: Protein Lynx Global Server yazılımından elde edilen skor değeri

Yapılan analizler sonucunda inokulasyondan sonraki 24, 48, 72 ve 96. Saatlerde patojenle inoküle edilen bitki dokularında kontrole göre farklı düzeyde eksprese edilen 77 protein tanımlandı. Bu proteinlerin %14'ünün patojen kaynaklı olduğu belirlendi. Tanımlanan bitkisel proteinler, rol aldıkları biyolojik olaylar göz önünde bulundurularak 7 grupta (fotosentez, metabolizma, gen ekspresyonu, elektron transportu, yapı, protein metabolizması ve savunma) sınıflandırıldı. 24. saatte patojenle inoküle örneklerde kontrole göre anlatım düzeyinin arttığı veya azaldığı tespit edilen 33 protein, 48. saatte 24 protein, 72. saat örneklerinde ise 34 protein tanımlanmıştır. Son grup olan 96. saat örneklerde ise 43 protein tanımlanmıştır. Her bir zaman diliminde tanımlanan proteinlerin fonksiyonel gruplara göre dağılımları ve oranları Şekil 4.11'de sunulmuştur.



Şekil 4.11: Tanımlaması yapılan proteinlerin fonksiyonlarına göre ayrıldığı 8 gruba göre dağılımları.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak artan talep doğrultusunda tarımsal alanlarda yetiştirilen ürün miktarını ve verimini yükseltmek üzere biyoteknolojik yöntemlerden geniş çapta yararlanılmaktadır. Bu alanda yürütülen moleküler çalışmaların önemli bir kısmı, çeşitli biyotik ve abiyotik stres etmenlerine karşı bitkinin sahip olduğu doğal dayanıklılık mekanizmalarının moleküler düzeyde aydınlatılması ve bu mekanizmalarda rol alan gen ve gen ürünlerinin belirlenmesi yönündedir. Bu çalışmaların ileriye dönük ortak hedefi; kısa sürede dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve son derece verimli, fakat hassas olan genotiplerin dayanıklı hale getirilmesine olanak sağlayacak yeni moleküler verilerin elde edilmesidir. Patojenle inokülasyon sonrasında, ister dayanıklı ister hassas olsun tüm konukçu bitkilerin proteomunda anlamlı değişimler meydana gelmektedir. Bitkinin patojen saldırısına karşı nasıl bir cevap oluşturacağı enfeksiyondan sonra anlatımı değişen proteinler ve bunların rol aldığı biyokimyasal dönüşümlerle yakından ilişkilidir. Biyolojik mekanizmalarda iş gören hedef enzim ve proteinlerin belirlenmesinde, günümüzde en çok tercih edilen yaklaşımlardan biri, daha somut veriler ortaya koyması nedeniyle proteomiktir. Proteom düzeyinde elde edilen veriler, dayanıklı yeni çeşitlerin kısa sürede geliştirilmesi ve verimli olan hassas genotiplerin istenilen özelliklerinin korunarak dayanıklı hale getirilmesi için yürütülen çalışmalara anlamlı katkılar sağlayabilecek potansiyele sahiptir.

Sarı pas hastalığı, dünya genelinde yayılım gösteren ve buğdayda ciddi verim kayıplarına neden olan bir hastalıktır. Bu nedenle tüm dünyada bir yandan klasik tarımsal yöntemlerle mücadele sürdürülürken, bir yandan da bitki ve patojene ait genetik ve moleküler veriler ortaya koyulmaya çalışılmaktadır. Bu yöndeki çalışmaların önemli bir kısmını bitkinin patojene karşı geliştirdiği hücresel cevabın moleküler düzeyde aydınlatılması yönündeki genomik ve transkriptomik çalışmalar oluşturmaktadır (Wang ve diğ., 2010; Coram ve diğ., 2008; Azevedo ve diğ., 2002; Parmil ve diğ., 2004; Zhang ve Klessig, 1997; Doehlemann ve diğ., 2006; Dreher ve Callis, 2007; Yamamoto ve diğ., 2004; van Loon ve diğ., 2006). Ancak literatürde buğdayda sarı pas hastalığına dayanıklılık mekanizmasının proteomik düzeyde incelendiği araştırma sayısı oldukça azdır (Ma ve diğ., 2009; Li ve diğ., 2011). Sunulan tez çalışması, ülkemizde yetişen yerel dayanıklı buğday çeşidi İzgi 2001'de, *Puccinia*

*striiformis* f. sp. *tritici* fungusunun neden olduğu sarı pas hastalığına karşı bitkinin ortaya koyduğu dayanıklılık cevabının proteom düzeyinde incelendiği bir çalışmadır. PF2D sistemi kullanılarak iki boyutlu fraksiyonlama ile ayrıştırılan bitki örnekleri, nanoLC-ESI-MS/MS sistemi ile kütle spektrometrik analizlerin ardından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Tezde elde edilen bulgular buğdayda sarı pas hastalığına dayanıklılık mekanizmasının aydınlatılmasına ışık tutacak, son derece yararlı bilgiler ortaya koymuştur.

Deneilerin ilk aşamasında patojenle inoküle edilmiş (enfekte) ve boş inokülasyon yapılmış (kontrol) bitkilerde inokülasyonu takip eden 24, 48, 72 ve 96. saatlerde örnek alınarak total protein izolasyonu yapılmıştır. Hazırlanan total protein örnekleri, iki boyutlu sıvı kromatografi sistemi olan PF2D’de ayrılarak fraksiyonlanmıştır. Bu ayrımlar sırasında elde edilen 1. ve 2. boyut pH ve UV kromatogram verileri sistemin yazılımları kullanılarak iki boyutlu sanal jel haritalarına dönüştürülmüştür. Bu şekilde her bir örnek için oluşturulan protein profilleri her zaman diliminde enfekte ve kontrol olacak şekilde karşılaştırmalı olarak analiz edilmiş ve anlatım düzeyi farklı olan proteinler tanımlanmak üzere seçilmiştir. Yapılan çalışmaların tamamı 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Seçilen proteinleri içeren 2. boyut fraksiyonlar nanoLC-ESI-MS/MS sisteminde analiz edilmiş peptid kütle ve amino asit kütle verileri elde edilmiştir. Kütle spektrometrik veriler PLGS yazılımı ile analiz edilip mevcut veri bankalarındaki protein bilgisi ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaların da yardımıyla protein tanımlamaları yapılmıştır. Son olarak literatürde bulunan bitki-patojen ilişkisine dair bilgilerden de yararlanılarak tanımlanan proteinlerin, bitkide sarı pas etmeni patojene karşı dayanıklılıktaki işlevleri açıklanmaya çalışılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda inokulasyondan sonraki 24, 48, 72 ve 96. saatlerde patojenle inoküle edilen bitki yapraklarında kontrole göre farklı düzeyde ekspres edilen 77 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerin %14’ünün patojen kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Patojenin bitki yapraklarına püskürtülerek uygulanmasının ardından hem patojende hem de bitkide çok sayıda protein sentezi gerçekleşmektedir. Bu nedenle tanımlanan proteinler arasında patojen tarafından sentezlenen proteinler başka çalışmalarda da rapor edilmiştir (Zhou ve diğ., 2006; Ma ve diğ., 2009). Tanımlanan bitkisel proteinler ise, rol aldıkları biyolojik olaylar göz önünde bulundurularak 7 grupta

(fotosentez, metabolizma, gen ekspresyonu, elektron transportu, yapı, protein metabolizması ve savunma yanıtı) sınıflandırılmıştır. Bitkisel proteinler arasında doğrudan dayanıklılık mekanizmasında rol aldığı bilinen PR-1, PR-4, PR-5 gibi patojenez ilişkili proteinlerin (pathogenes-related) yanı sıra katalaz, peroksiredoksin Q, peroksidaz, glutatyon S transferaz (GST) gibi önemli antioksidan enzim ve proteinler, kalmodulin ve profilin gibi sinyal iletiminde rol alan proteinleri içine alan savunma yanıtı proteinleri (toplamda %21) bulunmaktadır. Ayrıca tüm zaman dilimlerinde tanımlanan proteinlerin önemli bir kısmını (toplamda %21) bitki materyalinin yaprak dokusu olması nedeniyle, fotosentetik proteinler oluşturmaktadır. Bu proteinlerin kontrol ve enfekte bitki gruplarında görülen miktarları incelendiğinde enfekte bitkilerde inokülasyonun ardından ilk cevabın verilmesi için fotosentetik proteinlerin miktarında azalış yaşandığı daha sonraki saatlerde ise bitkinin kendi yaşamsal faaliyetlerinin normale dönmesiyle bu proteinlerin miktarlarının da arttığı görülmüştür. Bitkilerin patojenle karşılaşmalarının ardından savunma yanıtında rol alan proteinlerin yanı sıra fotosentetik proteinlerin ekspresyonunda da değişimler olduğu ve bunun savunmanın bir parçası olduğu pek çok çalışma ile de gösterilmiştir (Bilgin ve diğ., 2010; Li ve diğ., 2011).

Bu çalışmada tanımlanan proteinlerin büyük bir kısmının (%22) yer aldığı diğer bir fonksiyonel grup metabolizmadır. Özellikle savunmada rol aldığı öngörülen çeşitli biyomoleküllerin sentezi ve enerji üretimi ile ilişkili proteinler bu grupta toplanmıştır. Geri kalan az sayıda protein ise gen ekspresyonu (%8), protein metabolizması (%4), elektron transportu (%6) ve yapı (%4) olacak şekilde gruplandırılmıştır. Tanımlanan proteinlerin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler ile bunların bitkinin patojene karşı verdiği savunma cevabındaki olası rolleri fonksiyonel gruplar baz alınarak aşağıda tartışılmıştır.

#### Fungal Proteinler

Patojenik filamentli funguslar patojen-konukçu ilişkisi sürecinde yıkıcı enzimler, ekstraselüler enzim ve proteinler gibi bir takım proteinler oluşturur. Bu proteinler fitotoksin ve elisitör olarak; besin sağlanması, kolonizasyon, ekolojik etkileşimler, bitki savunma etkileşimlerini de içine alan birçok biyolojik reaksiyonda durdurucu/ters döndürücü olarak görev yapar. *Pst*-buğday etkileşimini içeren proteomik çalışmalar

genel olarak konukçudaki proteinlere odaklanmış olmakla beraber fungal proteinler hakkında bilgi veren birkaç çalışma da bulunmaktadır (Rampitsch ve diğ., 2006; Zhou ve diğ., 2006; Paper ve diğ., 2007; Song ve diğ., 2011). Bu tez çalışmasında 12 fungal protein belirlenmiştir (Tablo 5.1). Tanımlanan fungal proteinlerden biri, “RNA polimeraz II medyatör”dür ve tüm RNA polimeraz II-bağımlı genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev alan ko-aktivatör medyatör kompleksinin bir bileşenidir. Bu protein, bazal RNA polimeraz II transkripsiyon sistemi ile gene özgü düzenleyici proteinler arasında bilgi akışını sağlayan bir köprü görevi görmektedir (Hane ve diğ., 2007). Tanımlanan diğer fungal proteinlerden ikisi, E3 ubiquitin protein ligaz ve ubiquitin-benzeri proteindir. Bu proteinler, hücre döngüsü, günlük biyolojik süreçler, transkripsiyon gelişimi, sinyal iletimi ve besin duyarlılığı gibi süreçlerde önemli rol oynayan proteinlerin yeniden düzenlenme mekanizmasının önemli bir bileşeni olan ubiquitin yolağında rol alan proteinlerdendir (Jonkers ve Rep, 2009). Ayrıca ubiquitin-proteazom sisteminin patojenik fungusun virülensinin düzenlenmesi üzerine etkisi çalışılmış ve Spk1-Cullin-Fbox (SCF) kompleksinin yer aldığı ubiquitin-proteazom sisteminin patojenin virülens etkisi için önemli olduğu vurgulanmıştır (Liu ve Xue, 2011). Ubiquitin sisteminin proteinleri, *Fusarium* türleri, *Botrytis cinerea* ve *Magnaporthe oryzae* gibi birçok patojenik fungusta gösterilmiştir (Liu ve Xue, 2011; Paper ve diğ., 2007). Tez çalışmasında 72. saatte yeni sentezlendiği görülen bir diğer fungal protein DNA replikasyon kompleksi GINS protein PSF3’tür. Bu protein DNA replikasyonunun başlamasında önemli rol oynayan PSF3 protein ailesinin üyesidir. Fungal PSF3 DNA replikasyon kompleksinin 72. saatte yeni sentezlenmesi, patojenin konukçudan gelen direnç karşısında kendini korumak veya bu direnci kırmak üzere bir takım genlerin ekspresyonunu gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Tanımlanan fungal proteinler değerlendirildiğinde, beklendiği üzere enfeksiyon sonucunda yeni sentez oldukları gözlenmiştir. Gruplar arası değerlendirme yapıldığında ise, fungal proteinlerin patojenle ilk karşılaşılma dönemi olan 24. saat örneklerinde en yoğun biçimde görüldüğü belirlenmiştir. Daha sonraki zaman dilimlerinde az sayıda fungal protein tanımlanması bitkinin başarılı biçimde sürdürdüğü dayanıklılık cevabı ile patojenin etkisinin azaltıldığının bir kanıtı olarak kabul edilebilir.



Tablo 5.1: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan fungal proteinler.

Fungal Proteinler	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
Mitokondriyal iç membran proteaz ATP23			√ *					
Ubikitin benzeri protein (ATG12)	√ *							
DNA replikasyon kompleksi GINS protein PSF3					√ *			
Tip 1 fosfataz regülatör YPI1			√ *					
Ubikinin biyosentez protein	√ *							
Glukoz N asetil transferaz 1							√ *	
Sitokrom c					√ *			
Polycomb artırıcı benzeri protein 1							√ *	
ATP bağımlı RNA helikaz	√ *							
E3 ubikitin protein ligaz BRE1	√ *							
RNA polimeraz 2 medyatör	√ *							
Aktin	√ *							

\* İşaretili proteinler yeni sentezdir.

### Savunma Yanıtı İle İlişkili Proteinler

Sarı pas etmeni *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'nin dünyada 100 farklı ırkı mevcuttur ve bu funguslar ırka özgü Avr geni taşırlar. Farklı buğday çeşitleri de farklı patojen ırklarına spesifik R (dayanıklılık) genleri taşırlar. Bu genlerin ürünü olan proteinler, spesifik olduğu patojenin Avr proteinini algılayan reseptörlerdir ve bitkinin patojeni tanıyarak savunma cevabını harekete geçirmesini sağlarlar. Bitkideki savunma sinyal yolları R-Avr etkileşimi ile aktifleşirken bir yandan da enfekte organlar dışındaki bölgelerde sistemik kazanılmış bağışıklığı (SAR) tetikleyen salisilik asit (SA) birikimi gözlenir. Sinyal yollarının aktifleşmesi sonucu enfeksiyon bölgesinde plazma zarının geçirgenliğinde ve iyon taşınımında hızlı bir değişiklik meydana gelirken, ROS

üretiminde de belirgin bir artış gözlenir. Ayrıca antifungal protein ve bileşikler sentezlenir ve hücre duvarında kalınlaşma başlar (Robatzek ve Saijo, 2008). R-Avr etkileşimi sonucu bitkide gelişen en belirgin dayanıklılık cevabı enfeksiyon bölgesinde ortaya çıkan ve hipersenitif cevap (HR) olarak adlandırılan programlı hücre ölümleridir.

Tez çalışmasında patojenle inoküle 24. saat örneklerinde bitkinin erken savunma cevabında rol aldığı benzer çalışmalarda (Xingquan ve diğ., 2010; Coram ve diğ., 2008) da gösterilmiş olan PR-1, PR-4, peroksiredoksin Q ile glutasyon S transferaz (GST) proteinleri tanımlanmıştır (Tablo 5.2). Bu proteinlerden PR-1, literatürde belirtildiği gibi bitkinin biyotrofik bir fungal patojenle karşılaşmasının ardından geliştirilen SAR'ın önemli bir göstergesi olarak tanımlanmaktadır (Knepper ve Day, 2010). PR-1'in hem bitkide hem de *in vitro*'da antifungal özellik gösterdiği Niderman (1995) tarafından rapor edilmiş olmakla birlikte, son yıllardaki yayınlarda fonksiyonunun tam olarak bilinmediği belirtilmektedir (van Loon, 2006). Yirmi dördüncü saatte tanımlanan diğer bir PR proteini, PR-4 (Wheatwin)'tür. Bu protein de, antifungal özelliğe sahiptir; patojendeki kitin ve ksilenaza bağlanarak etkisini gösterir (Hurkman, 2009; Kamal, 2010). Caruso ve diğ. (2001) ise *in vitro*'da PR-4'ün patojen sporlarının germinasyonunu ve hif gelişimini engellediğini göstermişlerdir. PR-4 buğdayda sarı pas dayanıklılığı için karakteristik olan HR gelişiminde de rol almaktadır (Guevarave diğ., 2010, Wang ve diğ., 2010). Bu sayede hem patojen öldürülmekte hem de beslenebileceği kaynaklar kurutulmaktadır. Yirmi dördüncü saat örneklerinde tanımlanan savunma grubu proteinlerden diğer ikisi ise antioksidan özellikteki Peroksiredoksin Q ve GST'dir. Daha önce belirtildiği gibi bitkideki ilk savunma reaksiyonlarından biri de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi son derece toksik ve zararlı olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) bol miktarda ve hızlı biçimde üretilerek biriktirilmesidir. Bitki, bu moleküllerin toksik etkileri sayesinde bir yandan patojeni öldürerek bir yandan da HR oluşumunu tetikleyerek enfeksiyon gelişimini engellemeye çalışır. ROS'ların bir kısmı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e çevrilerek bitki hücre duvarının kalınlaşmasına yardımcı olup, böylece patojenin hücre içine girişini engellemeye çalışırken; bir yandan da dayanıklılıkla ilişkili genlerin ekspresyonu için sinyal görevi görür (Rouhier ve diğ., 2004). Ancak bu moleküllerin bitki için koruyucu ve öldürücü etkilerinin dengelenmesi gerekmektedir ve bunun için bitki antioksidan enzimler üretir. Peroksiredoksin Q peroksit ve peroksinitriti detoksifikiye eden bir peroksidazdır ve bitkilerin farklı biyotik ve abiyotik stresler karşısında maruz kaldığı

ROS'lara karşı kendilerini savunmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Baier ve Dietz, 1996). Patojen saldırılarında da enfeksiyon bölgesi dışındaki bitki hücrelerinde ROS konsantrasyonunun düşük seviyede tutulmasını sağlar (Bazargani ve diğ., 2011). Ayrıca peroksidazların suberin ve lignin sentezi gibi savunma ile ilişkili başka reaksiyonlarla da ilişkili olduğu bulunmuştur (Willekens ve diğ., 1997; Rizhsky ve diğ., 2002). Diğer bir antioksidan enzim olan GST, bir yandan normal hücrel metabolizma olaylarında rol alırken bir yandan da farklı ROS'ların detoksifikasyonunu sağlar (Li ve diğ., 2011). Bitkilerde çeşitli fungal enfeksiyonları takiben, hem patojen hem de bitki tarafından üretilen ROS'lardan korunmak üzere GST'nin yüksek miktarda eksprese edildiği birçok farklı çalışmada gösterilmiştir (Rouhier ve diğ., 2004; Zhou ve diğ., 2006; Larson ve diğ., 2007; Liao ve diğ., 2009; Li ve diğ., 2011). Analiz edilen 48, 72 ve 96. saat örneklerinin hepsinde antioksidan proteinlerin artışı devam etmiştir. Bu durum bize savunma cevabında ROS'ların aktif biçimde kullanıldığını göstermektedir.

Yirmi dördüncü saat örneklerinde herhangi bir sinyal proteinine rastlanmamışken, 48. saat örneklerinde kalmodulin (CaM) ve profilin, 72. saat örneklerinde ise sadece profilin sinyal ağındaki proteinler olarak tespit edilmiştir. Pek çok bitki grubunda kalsiyum iyonu önemli bir sinyal elemanı olarak görev yapmaktadır. Bitkilerdeki  $Ca^{+2}$  sinyalini algılayan birçok reseptör tanımlanmıştır. Bunlar arasında CaM en iyi bilinenlerden biridir ve ökaryotik organizmalar arasında iyi korunmuştur. Çok sayıda izoformu bulunan CaM'ların ekspresyonu biyotik ve abiyotik stres altındaki bitkilerde artmakta ve bu sayede ısı şoku proteinleri, kinazlar ve fosfatazlar gibi hedef enzim ve proteinler aktive edilmektedir (Yang ve Poovaiah, 2003). Profilin ise, ilk olarak huş ağacı anterlerinde aktinle bağlantılı bir protein olarak tanımlanmış ancak sonraki yıllarda bitkilerde sinyal iletiminde önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (Goldschmidt-Glermont ve diğ., 1991). Özellikle patojenin tanınması ve savunma reaksiyonlarında etkin bir sinyal proteini olan mitojen-aktifleşen protein kinaz (mitogen-activated protein kinases - MAPK)'in doğrudan substratı olarak tanımlanmış ve MAPK sinyal yolunun regulasyonunda rol aldığı rapor edilmiştir. Liao ve diğ. (2009)'nin pirinçte çeşitli elisitörlere karşı geliştirilen savunma cevabını inceledikleri bir çalışmalarında profilinin ekspresyon düzeyindeki artışı ortaya koymuşlardır.

Patojenle inokülasyondan 72. ve 96. saat sonra alınmış örneklerde, savunmada

doğrudan rol alan antioksidan ve sinyal proteinleri dışında yeni sentezlenen bir diğer önemli protein taumatin-benzeri proteindir. Bu protein PR-5 olarak da adlandırılır ve patojen fungusun hücre duvarına bağlanarak hücre membranının geçirgenliğini değiştirir (Roberts ve Selitrennikoff,1990). Pirinç, buğday ve tütün gibi pek çok bitkide fungal enfeksiyonların ardından PR-5 ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Chen ve diğ., 1999; Grover ve Gowthaman, 2003; Punja, 2005; Velazhahan ve Muthukrishnan, 2003).

Tablo 5.2: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan savunma proteinleri.

Savunma Yanıtı ile İlişkili Proteinler	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
Glutasyon S transferaz							√	
Patojenez ilişkili protein 4 (PR4, Wheatwin 1)	√ *							
Kalmodulin			√ *					
Peroksidaz fragment					√			
Taumatin benzeri protein (PR5)					√ *		√	
Glutasyon S transferaz 1								√
Dehidrin					√			
Profilin 1			√		√			
Katalaz 2					√		√	
Cys peroksiredoksin BAS1			√			√		√
Geç embriyogenez baskın protein grup 3			√			√		√
Peroksidaz					√		√	
Katalaz 1			√ *		√		√	
Peroksiredoksin Q (Kloroplastik)	√				√		√	
Glutasyon S transferaz	√							
Patojenez ilişkili protein 1 (PR1)	√							

\* İşaretili proteinler yeni sentezdir.

#### Fotosentez İle İlişkili Proteinler

Tez çalışmasında tanımlanan 77 proteinin %21'inin fotosentetik proteinler olduğu

belirlenmiştir ve bu proteinlerin her zaman dilimindeki ekspresyon farkları Tablo 5.3’de verilmiştir. Anlatım düzeyleri karşılaştırıldığında, patojen inokülasyonunu takiben 24. saatte genel olarak tüm fotosentetik proteinlerin miktarında azalma gözlenirken sonraki saatlerde bu proteinlerin anlatım düzeylerinde sürekli bir artış gözlenmiştir. Daha önce patojen mikroorganizmalar, böcek enfeksiyonları ve abiyotik stres uygulamalarını konu alan çalışmalarda da erken dayanıklılık cevabında fotosentetik proteinlerin anlatım düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (Li ve diğ., 2011; Bilgin ve diğ., 2010; Nabity ve diğ., 2009; Zhou ve diğ., 2006; Bilgin ve diğ., 2008; Zou ve diğ., 2005; Chinnusamy ve diğ., 2006; Bazargani ve diğ., 2011). Bu durum biyotik/abiyotik strese karşı verilen cevapta, kaynakların bitkinin doğal gelişimi yerine savunma amacıyla kullanılması için fotosentetik kapasitenin düşürülmesi ile açıklanmaktadır (Bilgin ve diğ., 2010; Zangerl ve diğ., 2002). enfekte örneklerde 24. saatte fotosentetik proteinlerin miktarındaki azalmanın bir başka sebebi de HR gelişimi olarak düşünülebilir. Bilindiği üzere HR, bitki-patojen etkileşiminde patojenin çoğalmasını ve besine ulaşmasını engelleyen, birçok savunma cevabını aktive eden hızlı ve etkili bir programlanmış hücre ölümü mekanizmasıdır. Bu mekanizma oksidatif patlama, plazma membranında iyon akışları, eksternal pH değişimleri (genellikle alkalinizasyon) ile karakterize edilir (Allen ve diğ., 1999). Yapılan benzer çalışmalarda, HR süresince fotosentez-ilişkili genlerin baskılandığı ve fotosentetik aktivitenin düştüğü rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2011; Allen ve diğ., 1999). Bazı çalışmalarda ise fotosentetik genlerin patojen inokülasyonu sonrası yeni sentez olduğu belirtilmişse de bu artışın patojenin henüz etkisini göstermediği yaprak kısımlarındaki kloroplastların aktivitesi ve komşu enfekte hücrelerin kaybıyla başa çıkmak için fotosentetik aktivitenin artırılması sonucu olduğu düşünülmektedir (Trumble ve diğ., 1993; Shen ve diğ., 2003).

Tanımlanan proteinler incelendiğinde fotosentez için en önemli proteinlerden olan RuBisCo’nun küçük ve büyük alt birimine ait birçok polipeptid görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda da RuBisCo proteininin fragmente olduğu belirlenmiş ve patojene karşı verilen savunmada ROS miktarındaki artışın bu yıkıma yol açabileceği belirtilmiştir (Li ve diğ., 2011).

Birçok fotosentetik proteinin erken cevap süresince (ilk 24 saat) azalması ve sonraki saatlerde artması patojene karşı verilen etkili bir erken cevabın bitki için ne kadar

önemli olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, bitkinin patojenle karşılaşmasının ardından metabolik aktivitelerini yavaşlatarak tüm gücünü savunmaya yönelik kullanmakta olduğunu, başarılı bir savunma gerçekleştirdikten sonra da normal metabolik faaliyetlerini artırarak yaşamsal gücünü toplamaya çalıştığını düşündürmektedir.

Tablo 5.3: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan fotosentetik proteinler.

Fotosentez İle İlişkili Proteinler	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
RuBisCo küçük zincir PWS4 3		√					√	
Klorofil a b bağlanan protein (kloroplastik)								√
RuBisCo küçük alt birim klon 512					√		√	
Fotosistem 1 demir sülfür merkezi					√		√	
RuBisCo büyük zincir		√	√		√		√	
Fotosistem Q B protein		√						
Fotosistem 2 CP47		√						
RuBisCo büyük zincir								√
Fosforibulokinaz		√	√		√		√	
RuBisCo küçük zincir PW9			√		√		√	
Oksijen etkinliğini artırıcı 1		√	√		√		√	
Fotosistem 1 demir sülfür merkezi		√	√		√		√	
Oksijen etkinliğini artırıcı 2		√	√		√		√	
Fotosistem 2 D2 protein					√			

#### Gen Ekspresyonu İle İlişkili Proteinler

Patojenin algılanması sonrasında konukçuda bir takım biyokimyasal değişimler meydana gelmektedir. Patojen inokülasyonu sonucu oluşturulan ilk değişim gen anlatım ve düzenleme mekanizmalarının yeniden organize olması, savunma ilişkili genlerin transkripsiyonel ya da posttranslasyonel aktivasyonudur (Zhu ve diğ., 1996). Tez

çalışmasında gen ekspresyonu ile ilişkili 5 protein tanımlanmıştır (Tablo 5.4). Bu grupta sınıflandırılan proteinlerden bazıları çeşitli araştırmacılar tarafından bitki savunması ile ilişkili olarak rapor edilmiştir. Örneğin, Ökaryotik translasyon başlatma faktörü E4-1 (eIF4E)'in temel fonksiyonunun yanısıra bitkide potivirüslere karşı dayanıklılıkta rol aldığı da rapor edilmiştir (Robaglia ve Caranta, 2006). Tanımlanan bir başka gen ekspresyon proteini ise kırılma faktörü Uaf2'dir. Bitkilerde alternatif kırılma gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır ve eksprese olan gen parçalarının farklı biçimlerde bir araya getirilerek farklı işlevsel proteinler üretilir. Özellikle stres faktörleri, kırılma ile ilişkili proteinlerin de içinde yer aldığı pek çok pre-mRNA'nın alternatif kırılmasına neden olan önemli etkenlerdir. Bu grupta tanımlanan bir diğer protein 50S ribozomal proteindir ve protein biyosentezinde rol alır. Benzer çalışmalarda dayanıklılık cevabında 50S ribozomal proteinin ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir.

Fonksiyonel olarak gen ekspresyonu ile ilişkili olduğu belirlenen proteinlerin farklı zamanlardaki dağılımları incelendiğinde tanımlanan proteinlerin büyük bir çoğunluğunun miktarında patojenle inokülasyon sonrası verilen erken cevap süresince (ilk 24. saatlik dilimde) artış olduğu görülmüştür. Daha sonraki saatlerde ekspresyon düzeylerinin benzer olması ise bitkinin erken savunma cevabının ardından metabolik faaliyetlerini yeniden düzenlemesi ve birçok gen seviyesinin inokülasyon öncesi dönem ile benzer hale gelmesi ile açıklanabilir.

Tablo 5.4: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan gen ekspresyon proteinleri.

Gen Ekspresyonu İle İlişkili Proteinler	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör E4-1	√		√					
Uzama faktörü	√							
Kırılma faktörü U2af büyük ünite	√							
50S ribozomal protein L9 (kloroplastik)						√	√	
50S ribozomal protein L9 (kloroplastik)	√							

### Protein Metabolizması İle İlişkili Proteinler

Tanımlanan proteinler içinde 3 tanesi protein metabolizması ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 5.5). Bu proteinler 24. saat örneklerinde anlatım düzeyinde artış göstermiş translasyon, işleme ve degradasyonda görev aldığı bilinen proteinlerdir. Bunlardan biri endoplazmik retikulum protein 72 kDa (Erp-72) olarak da bilinen disülfid izomerazdır ve moleküler ER şaperonu olarak görev almaktadır. ER şaperonları ER'de işlenen proteinlerin kalite kontrolünde kritik rol üstlenmelerinin yanısıra stres durumunda sinyal cevabının düzenlenmesinde de görev almaktadır. Erp-72, proteinlerdeki S-S bağlarının yeniden düzenlemesini katalizleyen büyük şaperon multiprotein kompleksinin bir parçasıdır. Sitoplazmik şaperonların doğal bağışıklık süresince fonksiyonu birçok grup tarafından detaylı olarak araştırılmıştır. Buna rağmen ER şaperonlarının doğal bağışıklık sürecindeki fonksiyonu çok az bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda doğal bağışıklık sürecinde başarılı bir savunma cevabı oluşturmak için reseptör benzeri kinazların indüklenmesine yardımcı olarak ER şaperonlarının miktarında artış gözlemlendiği belirlenmiştir (Caplan ve diğ., 2009). Birçok metabolik bitki yolağı kendilerini kontrol eden enzimlerin dengeli sentezi ve yıkımı ile düzenlenir. Bitkilerde ubiquitin-proteazom sistemi patojen saldırısına cevabı da içine alan çevresel ve endojen sinyalleri ayarlar (Hare ve diğ., 2003, Delaure ve diğ., 2008).

SKP1 ubiquitinasyon sisteminde ve hedef proteinlerin proteozomal degradasyonunda önemli bir proteindir. Skp1, k ve F-box proteini ile birlikte SCF kompleksini (E3 Ligazlar) oluşturur ve hedef proteinin belirlenmesi için gereklidir. Çeşitli araştırma grupları tarafından edinilen sonuçlar E3 ligazlar ile ilgili proteinlerin yıkımının hastalık dayanıklılığındaki sinyal iletiminde önemli role sahip olduğunu göstermiştir (Devoto ve diğ., 2003; Zeng ve diğ., 2006; Dreher ve Callis, 2007).

Tablo 5.5: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan protein metabolizması proteinleri

Protein Metabolizması İle İlişkili Proteinler	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
Ubikitin konjuge enzim E2 2							√	
Protein disülfid izomeraz (Erp72)	√				√			
SKP1 benzeri protein	√							



### Metabolizma İle İlişkili Proteinler

Tanımlanan proteinler incelendiğinde 17 proteinin metabolizma reaksiyonlarında görevli olduğu belirlenmiştir (Tablo 5.6). Adenin fosforibozil transferaz ve sistein sentaz amino asit biyosentezinde görev alan proteinlerdir. Myo-Inositol-1-fosfat sentaz, D-glukoz 6-fosfat'ın 1L-myo-inositol-1-fosfata dönüşümünü katalizler. Bu dönüşüm fosfolipidleri de içeren tüm inositol-içeren bileşenlerin üretiminde doğrudan ya da dolaylı yollarda ilk basamaktır. İnositol fosfatlar ayrıca sinyal iletiminde de önemli rol oynarlar. ATP sentaz, enerji metabolizmasında görev alan ve membran boyunca proton gradiyenti varlığında ADP'den ATP üreten önemli bir enzimdir.

Tablo 5.6: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan metabolizma proteinleri.

Metabolizma İle İlişkili Proteinler	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
S adenzimetiyonin sentaz 1			√			√		√
S adenzimetiyonin sentaz 1			√			√		√
Fruktoz 1 6 bifosfaz (kloroplastik)					√			√
ATP sentaz alfa alt ünitesi (kloroplastik)								√
Glukoz 1 fosfat adenil transferaz büyük ünite							√	
Fosfogliserat kinaz		√				√	√	
ATP sentaz beta alt ünitesi (kloroplastik)							√	
Dihidrodipikolinat sentaz 1								√
Sistein sentaz	√							√
Sedoheptuloz 1 7 bifosfaz			√					
ATP sentaz epsilon zinciri	√			√			√	
Plazma membran ATPaz								√
Fosfomannomutaz						√		
Adenin fosforibozil transferaz	√						√	
NADP bağımlı gliser aldehit 3 fosfat dehidrojenaz						√		
Translasyonel kontrollü tümör protein homolog			√				√	
İnositol 3 fosfat sentaz	√							

#### Elektron Transportu İle İlişkili Proteinler

Tanımlanan 77 proteinden 5'i elektron transport grubuna ayrılmış ve Tablo 5.7'de gösterilmiştir. Sitokrom b6 f kompleks (Cyt b6/f) hem lineer elektron transportunda (ATP ve NADPH üretiminde) hem de siklik elektron transportunda (sadece ATP üretimi) rol almasının yanı sıra kloroplastlardaki elektron transportunda da önemli rol

üstlenir. Kloroplastlardaki elektron transport seviyesi ile Cyt b6/f arasında doğru bir orantı vardır (Price ve diğ., 1995; Price ve diğ., 1998).

Tiyoredoksinler (Trx) bol miktarda bulunan ve evrimsel süreçte korunmuş, *in vivo* disülfid redüktaz aktivite gösteren proteinlerdir. Tiyoredoksin M tip protein bilinen 4 tip Trx proteinlerinden biridir ve NADP-malat dehidrojenazı aktiveleştirir (Kong ve diğ., 2000). Tanımlanan bir diğer elektron transport proteini ise ferredoksin (kloroplastik)'dir. Ferredoksin ve tiyoredoksinin birlikte işlev görerek kloroplastlardaki fotosentezi düzenlediği ve ferredoksin miktarındaki değişimlerin tiyoredoksin miktarıyla doğru orantılı olduğu belirtilmiştir (Wolosiuk ve Buchanan, 1977). Bununla birlikte tiyoredoksinlerin bitkide oksidatif stres cevabıyla ilişkisi de araştırılmıştır. Bitki hücreleri askorbik asit, glutatyon ve birçok farklı enzim gibi düşük moleküler ağırlıkta bileşenleri içeren kompleks bir süpürücü sistemin etkisi sonucu ortaya çıkan yüksek miktarda ROS üretimiyle başa çıkmak için mekanizma geliştirmiştir. Tiyoredoksinlerin bitki antioksidan savunma mekanizmasında rol aldığı düşünülmektedir (Santos ve Rey, 2006).

Tablo 5.7: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ile enfekte buğday yapraklarında tanımlanan elektron transport proteinleri.

Elektron Transportu İle İlişkili Proteinler	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
Sitokrom b6 f kompleks demir sülfür		√	√			√		
Tiyoredoksin M tip	√		√			√	√	
Apositokrom			√		√			√
Ferredoksin (kloroplastik)			√*		√		√	
Sitokrom b6								√

\* İşaretili protein yeni sentezdir.



Günümüzde proteomik alanındaki hızlı teknolojik gelişmeler sayesinde sadece bir canlı sistemde, belirli bir dönemde bulunan tüm proteinlerin tanımlanması değil aynı zamanda yapısal ve işlevsel özelliklerinin, birbirleri ile olan etkileşimlerinin belirlenmesi ve sinyal ağlarının ortaya konulması da olası hale gelmiştir. Ancak bitki türlerinde karşılaşılan metodolojik sıkıntıların yanı sıra genomik ve proteomik veri tabanlarının diğer organizmalara göre daha sınırlı oluşu nedeniyle proteomiğin sunduğu potansiyel, bitki moleküler biyolojisi alanında daha geç başlamış ve daha sınırlı kalmıştır (Jorin ve diğ., 2007). Bununla birlikte son yıllarda artan bir ivme ile kullanımı yaygınlaşmaktadır. Özellikle ülkemizde henüz başlangıç aşamasında olan bitki proteomiği alanında, sadece birkaç grup çalışmaktadır. Bu nedenle sunulan tez çalışmasıyla, son yıllarda tüm dünyada önemi giderek artarak devam eden bitki proteomiği alanında ülkemizdeki çalışmaların yaygınlaşmasına ve güçlenmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

Sunulan tez çalışması ile dayanıklı buğday çeşidinde sarı pas saldırısına karşı erken dönemde hızlı bir artış gösteren ve daha sonraki süreçlerde sentezi devam eden dayanıklılıktan sorumlu proteinler tanımlanmıştır. Bunlar arasında özellikle bitki savunma cevabında doğrudan rol aldığı bilinen son derece önemli olan patojenez-ilişkili protein sınıfına ait PR-1, PR-4 ve PR-5 proteinleri başta olmak üzere oksidatif stres-ilişkili katalaz, peroksiredoksin ve GST proteinleri ile sinyal iletiminde rol alan profilin ve CaM proteinleri yer almaktadır. Bu proteinlerin bir kısmı bitkilerde özellikle biyotrofik fungal patojenlere karşı verilen ve etkin bir savunma cevabı olan HR'de de rol almaktadır.

Ayrıca tanımlanan proteinler buğdayda sarı pas dayanıklılığına ilişkin olarak yapılan moleküler çalışmalarla ortaya konulan sonuçlarla da örtüşmektedir. Bununla birlikte aynı konuda yapılmış sınırlı sayıda proteomik çalışmalarla kıyaslandığında, sunulan çalışmada literatürdeki bilgilere ek olarak ilk kez görülen doğrudan bitki savunma cevabında önemli rol aldığı bilinen ve patojen-konukçu etkileşiminde etkin rol oynayan proteinler bulunmaktadır. Sonuç olarak bu çalışma ile ortaya konan sonuçların, buğdayda sarı pasa karşı verilen savunma cevabının daha iyi anlaşılmasına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Genel olarak proteomik çalışmalarda tanımlanan proteinlerin ve ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların, karşılaştırılmal gen ekspresyonu analizleri veya Western Blot yöntemi ile doğrulanması uygun görölmektedir. İleriki çalışmalarda özellikle doğrudan savunmada görevli olan proteinlere yönelik olarak işlevsel genomik çalışmalar yapılarak bu proteinlerin savunmadaki etkinliklerinin ortaya konulmasının önemli olduğu düşünölmektedir. Bu sayede genetik tekniklerin sunduğu olanaklardan da yararlanılarak sarı pas hastalığına karşı mücadelede daha etkin ve hızlı özömlerin geliştirilebileceği düşünölmektedir. Tez çalışmasında zaman ve bütçe kısıtlılığı nedeniyle bu analizlere yer verilememiştir, ancak bu doğrulamaların en kısa sürede yapılması planlanmaktadır. Ayrıca tez çalışmasında elde edilen MS/MS verileri, bitki materyalinin buğday olması nedeniyle doğrudan buğday protein veri bankası taranarak değerlendirilmiştir. Mevcut MS/MS verileri Viridiplantae protein veri bankasında tarama yapılarak diğer bitkilerdeki homologları belirlenebilir.

## KAYNAKLAR

AGRAWALA, G. K., YONEKURAB, M., IWAHASHIC, Y., IWAHASHIC, H., RAKWAL, R., 2005, System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *Journal of Chromatography*, (815):137–145.

ALAM, J., 2004, *Improvement of growth and yield of bread wheat by means of chemical manipulation under glass house conditions*, Yüksek Lisans Tezi, University of the Free State.

ALLEN, L. J., MACGREGOR, K. B., KOOP, R., BRUCE, D. H., KARNER, J., BOWN, A. W., 1999, The Relationship between Photosynthesis and a Mastoparan-Induced Hypersensitive Response in Isolated Mesophyll Cells, *Plant Physiology*, 119, 1233–1241.

ATAE (Ankara Tarım Araştırmaları Enstitüsü), 2012, <http://www.ataem.gov.tr/tesces.asp?s1=146&s2=37&s3=74&s2b=Bu%F0day> [Ziyaret Tarihi: 1 Mayıs 2012].

ATCHISON, J., HEAD, L., GATES, A., 2010, Wheat as food, wheat as industrial substance; comparative geographies of transformation and mobility, *Geoforum* 41, 236–246.

ATKINSON, M. M., KEPPLER, L. D., ORLANDI, E.W., BAKER, C.J., MISCHKE, C.F., 1990, Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and hypersensitive responses in tobacco, *Plant Physiology*, 92, 215–221.

AZEVEDO, C., SADANANDOM, A., KITAGAWA, K., FREIALDENHOVEN, A., SHIRASU, K., SCHULZE-LEFERT, P., 2002., The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene- triggered disease resistance, *Science*, 295, 2073–2076.

BAIER, M, DIETZ, K. J., 1996, Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases, *Plant Molecular Biology*, 31:553–564.

BARBIERI, L., BATELLI, M. G., STRIPE, F., 1993, Ribosome-inactivating proteins from plants, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154:237–282.

BARRE, O., SOLIOZ, M., 2006, Improved protocol for chromatofocusing on the ProteomLab PF2D, *Proteomics*, 6, 5096-5098.

BAZARGANI, M. M., SARHADI, E., BUSHERRI, A. A., MATROS, A., MOCK, H. P., NAGHAVI, M. R., HAJIHOSEINI, V., MARDI, M., HAJIREZAEI, M. R.,

- MORADI, F., EHDAIE, B., SALEKDEH, G. H., 2011, A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat, *Journal of Proteomics*, 74(10):1959-1973.
- BELKHADIR, Y., SUBRAMANIAM, R., DANGL, J.L., 2004, Plant disease resistance protein signalling: NBS-LRR proteins and their partners, *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 391–399.
- BENT, A. F., MACKEY, D., 2007, Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions, *Annual Review of Phytopathology*, 45: 399-436.
- BILGIN, D. D., ALDEA, M., O'NEILL, B.F., BENITEZ, M., LI, M., CLOUGH, S.J., DELUCIA, E. H., 2008, Elevated ozone alters soybean-virus interaction, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 1297–1308.
- BİLGİÇ., H., 2004, *Anadolu uygarlıklarının izinde buğdayın kökleri*, Buğday Ekolojik Yaşamı Destekleme Derneği, [http://www.bugday.org/portal/haber\\_detay.php?hid=121](http://www.bugday.org/portal/haber_detay.php?hid=121), [Ziyaret Tarihi: 20 Mart 2012].
- BRADFORD, M. M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- CAPLAN, J.L., ZHU, X., MAMILLAPALLI, P., MARANHE, R., ANANDALAKSHMI, R., and DINESH-KUMAR, S. P., 2009, Induced ER chaperones regulate a receptor-like kinase to mediate antiviral innate immune response in plants, *Cell Host Microbe*, 6, 457–469.
- CHEN, X.M., 2005, Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27, 314–337.
- CHEN, X.M., MOORE, M. K., WOOD, D. A., 2003, Epidemics and control of stripe rust on spring wheat in the Pacific Northwest in 2002, *Phytopathology*, 93: 16.
- CHEN, W. P., CHEN, P. D., LIU, D.J., KYNAST, R., FRIEBE, B., 1999, Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene, *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 755–760.
- CHINNUSAMY, V., ZHU, J., ZHU, J. K., 2006, Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 52-61.
- CORAM, T. E., WANG, M., CHEN X. M., 2008, Transcriptome analysis of the wheat–*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction, *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 157–169.
- CORWIN, D.L., LESCH, S.M., 2005, Apparent soil electrical conductivity measurements in agriculture, *Computers and Electronics in Agriculture*, 46, 11-43.



DEFALCO, T. A., BENDER, K. W., SNEDDEN, W. A., 2010, Breaking the code: Ca<sup>2+</sup> sensors in plant signalling, *Biochemical Journal*, 425: 27–40.

DELAURE, S. L., VAN-HEMELRIJCK, W., DEBOLLE, M. F. C., CAMMUE, B. P. A., DECONINCK B. M. A., 2008, Building up plant defenses by breaking down proteins, *Plant Science*, 174, 375–385.

DELUCCA, A. J., HED, L. O., INGBER, B., BHATNAGAR, D., 2011, Antifungal Properties of Wheat Histones (H1 H4) and Purified Wheat Histone H1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6933–6939.

DEMPSEY, D. A., SHAH, J., KLESSIG, D. F., 1999, Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(4), 47–575.

DEVOTO, A., MUSKETT, P. R., SHIRASHU, K., 2003, Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 307–311.

DOEHLEMANN, G., BERNDT, P., HAHN, M., 2006, Different signalling pathways involving a G $\alpha$  protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia, *Molecular Microbiology*, 59(3), 821–835.

DONG, X., 1998, SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 1(4), 316-323.

DREHER, K., CALLIS, J., 2007, Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants, *Annals of Botany*, 99 (5), 787-822.

DURRANT, W.E., DONG, X., 2004, Systemic acquired resistance, *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209.

DUSUNCELI, F., CETIN, L., ALBUSTAN, S., EKIZ, H., 2000, Orta Anadolu buğday ekilişlerinde pas hastalıklarının (*Puccinia* spp.) yaygınlığı, önemi ve alınması gereken tedbirler, Orta Anadolu'da hububat tarımının sorunlar ve çözüm yollar Sempozyumu, Konya, 8-11 Haziran 1999, 693-696.

ECKARDT, N. A., 2006, Identification of Rust Fungi Avirulence Elicitors, *The Plant Cell*, 18:1-3.

ERZURUM VALİLİĞİ İL TARIM MUDURLUGU, 2011, Pas hastalıkları ve mücadelesi, Erzurum Valiliği İl Tarım Müdürlüğü, 25-02-2011-01.

FAO (BM Gıda ve Tarım Örgütü-Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2010, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> [Ziyaret Tarihi: 10 Şubat 2012]

GREENBERG, J. T., 1997, Programmed cell death in plant-pathogen interactions, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 525–545.

GROVER, A., GOWTHAMAN, R., 2003, Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants, *Current Science*, 84, 330–340.

GURURANI, M.A., VENKATESH, J., UPADHYAYA, C.P., NOOKARAJU, A., PANDEY, S.K., PARK, S.W., 2012, Plant disease resistance genes: Current status and future directions; *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 51-65.

HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D. G., 1996, Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses, *The Plant Cell*, 8, 1773-1791.

HANE, J.K., LOWE, R.G.T, SOLOMON, P.S., TAN, K.C., SCHOCH, C.L., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W., KODIRA, C., BIRREN, B.W., GALAGAN, J.E., TORRIANI, S.F.F., McDONALD, B.A., OLIVER, R.P., 2007, Dothideomycete–Plant Interactions Illuminated by Genome Sequencing and EST Analysis of the Wheat Pathogen *Stagonospora nodorum*, *The Plant Cell*, 19, 3347-3368.

HARE, P.D., SEO, H.S., YANG, J.Y., CHUA, N.H., 2003, Modulation of sensitivity and selectivity in plant signaling by proteasomal destabilization, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 453–462.

HEPLER, P. K., 2005, Calcium: A central regulator of plant growth and development, *Plant Cell*, 17, 2142–2155.

HEUN, M., SHAFER-PREGL, R., KLAWAN, D., CASTANGA, R., ACCERBI, M., BORGHI, B., SALAMINI, F., 1997, Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting, *Science*, 278, 1312-1314.

HOVMOLLER, M. S., SORENSEN, C. K., WALTER, S., JUSTESEN, A. F., 2011, Diversity of *Puccinia striiformis* on Cereals and Grasses, *Annual Review of Phytopathology*, 49,197–217.

HOWE, G. A., 2004, Jasmonates as Signals in the Wound Response, *Journal of Plant Growth Regulation*,23, 223–237.

HURKMAN, W. J., VENSEL, W. H., TANAKA C.K., WHITEHAND, L., ALTENBACH, S. B., 2009, Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain, *Journal of Cereal Science*, 49: 12-23.

JANSEN, R. C., NAP, J. P., MLYNAROVA, L., 2002, Errors in genomics and proteomics, *Nature Biotechnology*, 20,19.

JONES, J. D. G., DANGL, J. L., 2006, The plant immune system, *Nature*, 444, 323-329.

JONKERS, W., REP, M., 2009, Lessons from fungal F-box proteins, *Eukaryot Cell*, 8, 677-695.

JORRIN, J. V., MALDONADO, A. M., CASTILLEJO, M. A., 2007, Plant proteome analysis: a 2006 update, *Proteomics*, 7, 2947–2962.

KARAKAŞ, Ö., 2010, *Kışlık ekmeklik buğday (Triticum aestivum L.)’da sarı pas hastalığına dayanıklılığın biyoteknolojik yöntemlerle incelenmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.

KAVANO, T., SAHASHI, N., TAKAHASHI, K., UOZUMI, N., MUTO, S., 1998, Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction, *Plant Cell Physiology*, 39, 721–730.

KAWASAKI, H., IWAMURO, S., 2008, Potential Roles of Histones in Host Defense as Antimicrobial Agents, *Infectious Disorders - Drug Targets*, 8(3), 195-205.

KIM, S. T., CHO, K. S., YU, S., KIM, S.G., HONG, J.C., HAN, C.D., BAE, D.W., MYUNG, A.E., KANG, K.Y., 2003, Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by the rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells, *Proteomics*, 3, 2368–2378.

KITAJIMA, S., SATO F., 1999, Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function, *Journal of Biochemistry*, 125,1–8.

KNEPPER, C., DAY, B., 2010, From Perception to Activation: The Molecular-Genetic and Biochemical Landscape of Disease Resistance Signaling in Plants, *The Arabidopsis Book* 8, e012.

KNIGHT, H., 2000, Calcium signaling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytology*, 195: 269–324.

KOLMER, J.A., 2005, Tracking wheat rust on a continental scale, *Current Opinion in Plant Biology*, 8,441–449.

KONG, W., SHIOTA, S., SHI, Y., NAKAYAMA, H., NAKAYAMA, K., 2000, A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin comigratory protein (Bcp), *Biochemistry Journal*, 351, 107-114.

KONING, A. J., TANIMOTO, Y. E., KIEHNE, K., ROST, T., COMAIA, L., 1991, Cell-Specific Expression of Plant Histone H2A Genes, *The Plant Cell*, 3, 657-665.

KOORNEEF, A., PIETERSE, C.M., 2008, Cross talk in defense signaling, *Plant Physiology*, 146, 839–844.

LAMB, C., DIXON, R. A., 1997, The oxidative burst in plant disease resistance, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251–75.

LARSON, R. L., HILL, A. L., NUNEZ, A., 2007, Characterization of Protein Changes Associated with Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Resistance and Susceptibility to *Fusarium oxysporum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7905–7915.

LAZNIEWSKA, J., MACIOSZEK, V.K., LAWRENCE, C.B., KONONOWICZ, A.K., 2010, Fight to the death: *Arabidopsis thaliana* defense response to fungal necrotrophic pathogens; *Acta Physiologiae Plantarum*, 32,1–10.

LEON-REYES, A., SPOEL, S. H., DELANGE, E. S., ABE, H., KOBAYASHI M., TSUDA, S., MILLENAAR F. F., WELSCHEN, R. A. M., RITSEMA, T., PIETERSE, C. M. J., 2009, Ethylene Modulates the Role of nonexpressor of pathogenesis-related genes-1 in Cross Talk between Salicylate and Jasmonate Signaling, *Plant Physiology*, 149, 1797–1809.

LEVINE, A., PENNELL, R.I., ALVAREZ, M.E., PALMER, R., LAMB, C., 1996, Calcium-mediated apoptosis in plant hypersensitive disease resistance response, *Current Biology*, 6, 427–437.

LI, G. Q., LI, Z. F., YANG, W. Y., ZHANG, Y., HE, Z. H., XU, S. C., SINGH, R. P., QU, Y. Y., XIA, X. C., 2006, Molecular mapping of stripe rust resistance gene YrCH42 in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with Yr24 and Yr26, *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1434-1440.

LI, H., WEI, G., HUANG, J.X.L., KANG, Z., 2011, Identification of wheat proteins with altered expression levels in leaves infected by the stripe rust pathogen, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2423–2435.

LISKA, A.J., POPOV, A.V., SUNYAEV, S., COUGHLIN, P., HABERMANN, B., SHEVCHENKO, A., BORK, P., KARSENTI, E., SHEVCHENKO, A., 2004, Homology-based functional proteomics by mass spectrometry: application to the *Xenopus* microtubule-associated proteome, *Proteomics*, 4, 2707–2721.

LIU, T. B., XUE, C., 2011, The Ubiquitin-Proteasome System and F-box Proteins in Pathogenic Fungi, *Mycobiology*, 39(4), 243-248.

LOAKE, G., GRANT, M., 2007, Salicylic acid in plant defence - the players and protagonists, *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 466–472.

MA, C., XU, S.C., XU, Q., ZHANG, Z.H., PAN, Y.H., 2009, Proteomic analysis of stripe rust resistance wheat line Taichung29\*6/Yr5 inoculated with stripe rust race CYR32. *Scientia Agricultura Sinica*, 42, 1616–1623.

MAMLUK, O.F., CETIN, L., BRAUN, H.J., BOLAT, N., BERTSCHINGER, L., MAKKOUK, K. M., YILDIRIM, A.F., SAARI, E.E., ZENCIRCI, N., ALBUSTAN, S., CALI, S., BENIWAL, S.P.S., DUSUNCELI, F., 1997, Current status of wheat and barley diseases of Central Anatolian Plateau of Turkey, *Phytopathology Medite.* 36, 167-181.

MARSALIS, M.A., NATALIE, N.P., 2006, Leaf, Stem and Stripe Rust Diseases of Wheat, *University of Nebraska–Lincoln Extension Publications*, G1245.

MAYTALMAN, D., 2011, *Buğday (Triticum aestivum L.) Proteomik Çalışmalarında Yeni Nesil İki Boyutlu Sıvı Kromatografi (2D-LC) Sistemi Kullanımı*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.

MCAINSH, M. R., PITTMAN, J. K., 2009, Shaping the calcium signature, *New Phytologist*, 181, 275–294.

MCINTOSH, R.A., DEVOS, K.M., DUBCOVSKY, J., ROGERS, W.J., MORRIS, C.F., APPELS, R., SOMERS, D.J., ANDERSON, O.A., 2008, Catalogue of gene symbols for wheat: 2008.

MCNEAL, F. H., KONZAK, C. F., SMITH EP, TATE, W. S., RUSSELL., 1971, A uniform system for recording and processing cereal research data, *USDA*, 34-121.

MERKLE, T., GRASSER, K. D., 2011, Unexpected mobility of plant chromatin-associated HMGB proteins, *Plant Signaling & Behavior*, 6,6, 878-880.

NABITY, P.D., ZAVALA, J.A., DELUCIA, E.H. (2009) Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. *Annals of Botany*, 103, 655–663.

NIDERMAN, T., GENETET, I., BURYENE, T., GEES, R., STINTZI, A., LEGRAND, M., FRITING, B., MOSINGER, E., 1995, Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterisation of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, 108,17-27.

PAPER, J. M., SCOTT-CRAIG, J. S., ADHIKARI, N. D., CUOMO, C. A., WALTON, J. D., 2007, Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*, *Plant Proteomics*, 7(17), 3171-3183.

PARK, A.K., 2004, Proteomic studies in plant, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 133-138.

PARMIL, K. B., RASHID, A., KITAGAWA, K., 2004, Sgt1 Associates with Hsp90: an Initial Step of Assembly of the Core Kinetochore Complex, *Molecular and Cellular Biology*, 24(18), 8069-8079.

PENG, J.H., SUN, D., NEVO, E., 2011, Domestication evolution, genetics and genomics in wheat, *Molecular Breeding*, 28, 281–301.

PENG, M., KUC, J., 1992, Peroxidase-Generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks, *Phytopathology*, 82, 696-699.

PIMENTEL, D., 1991, Diversification of biological control strategies in agriculture, *Crop Protection*, 10, 243–253.

- PIMENTEL, D., 2002, Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal and Microbe Species, *CRC Press*, 384.
- PRICE, G. D., VONCAEMMERER, S., EVANS J. R., SIEBKE, K., ANDERSON J. M., BADGER, M. R., 1998, Photosynthesis is strongly reduced by antisense suppression of chloroplastic cytochrome b6 complex in transgenic tobacco, *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 445–452.
- PRICE, G. D., YU, J. W., VONCAEMMERER, S., EVANS, J. R., CHOW, W. S., ANDERSON, J. M., HURRY, V., BADGER, M. R., 1995, Chloroplast cytochrome b6/f and ATP synthase complexes in tobacco: transformation with antisense RNA against nuclear-encoded transcripts for the Rieske FeS and ATP polypeptides *Australian Journal of Plant Physiology*, 22, 285–297.
- PUNJA, Z. K., 2005, Transgenic carrots expressing a thaumatin-like protein display enhanced resistance to several fungal pathogens, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27, 291–296.
- RAMPITSCH, C., BYKOVA, N.V., MCCALLUM, B., BEIMCIK, E., ENS W., 2006, Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction, *Proteomics*, 6, 1897–1907.
- REDDY, A. S., 2001, Calcium: Silver bullet in signaling, *Plant Science*, 160, 381–404.
- REYMOND, P., FARMER, E. E., 1998, Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression, *Current Opinion Plant Biology*, 1, 404–411.
- ROBAGLIA, C., CARANTA, C., 2006, Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection, *Trends in Plant Science*, 11, 40–45.
- ROBATZEK, S., SAIJO, Y., 2008, Plant immunity from A to Z, *Genome Biology*, 9, 304–308.
- ROUHER, N., GELHAYE, E., GUALBERTO, J. M., JORDY, M. N., DEFAY, E., HIRASAWA, M., DUPLESSIS, S., LEMAIRE, S. D., FREY, P., MARTIN, F., MANIERI, W., KNAFF, D. B., JACQUOT, J. P., 2004, Poplar Peroxiredoxin Q. A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense, *Plant Physiology*, 134(3), 1027–1038.
- SANTOS, C. V., REY, P., 2006, Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response, *Trends in Plant Science*, 11(7), 329–334.
- SEAH, S., BARIANA, H., JAHIER, J., SIVASITHAMPARAM, K., LAGUDAH, E. S., 2001, The introgressed segment carrying rust resistance genes Yr17, Lr37 and Sr38 in wheat can be assayed by a cloned disease resistance gene-like sequence TAG. *Theoretical and applied genetics*, 102(4), 600–605.

SELITRENNIKOFF, C.P., 2001, Antifungal Proteins, *Applied and Environmental Microbiology*, 2883–2894.

SHEN, S., JING, Y., KUANG, T., 2003, Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath, *Proteomics*, 3, 527-535.

SINGH, R.P., HUERTA-ESPINO, J., 2001, Research Highlights of the CIMMYT Wheat Program, 1999- 2000 CIMMYT. Mexico, D.F. pp:38-40.

SONG, X., RAMPITSCH, C., SOLTANI, B., MAUTHE, W., LINNING, R., BANK, T., MCCALLHUM, B., BAKKEREN, G., Proteome analysis of wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*, infection structures enriched for haustoria, *Proteomics*, 11, 944–963.

SPOEL, S.H., DONG, X., 2008, Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses, *Cell Host & Microbe*, 3, 348–351.

TODOROVSKA, E., CHRISTOV, N., SLAVOV, S., CHRISTOVA, P., VASSILEV, D., 2009, Biotic stress resistance in wheat - breeding and genomic selection implications, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23 (4), 1417-1426.

TÖR, M. 1998, Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki Son Gelişmeler, *Turkish Journal of Biology*, 22, 271-285.

TREWAVAS, A. J., MALHO, R., Ca<sup>2+</sup> signalling in plant cells: the big network!, *Current opinion in Plant Biology*, 1(5), 428–433.

TRUMBLE, J.T., KOLONDY-HIRSCH, D. M., TING, I. P., 1993, Plant compensation for arthropod herbivory, *Annual Review Entomology*, 38, 93–119.

TSUDA, K., SATO, M., GLAZERBOOK, J., COHEN, J. D., KATAGIRI, F., 2008, Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses, *The Plant Journal*, 53(5), 763–775.

TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu), 2010, <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>, [Ziyaret Tarihi: 28 Nisan 2012].

USDA, 2012, United States of Department Agriculture <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=TRAE>, [Ziyaret Tarihi: 25.05.2012]

van LOON, L. C., REP, M., PIETERSE, C. M. J., 2006, Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants, *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135–162.

VELAZHAHAN, R., MUTHUKRISHNAN, S., 2003, Transgenic tobacco plants constitutively over-expressing a rice thaumatin-like protein (PR-5) show enhanced resistance to *Alternaria alternate*, *Plant Biology*, 47, 347–354.

VERK, M.C., GAZ, C., LINTHROST, H.J.M, 2009, Transcriptional regulation of plant defense responses, *Advances in Botanical Research*, 51, 397-438.

WALKER, J.M., 2002, The protein Protocols Handbook, Second edition, Humana Press.

WANG, X., WEI, L., CHEN, X., TANG, C., DONG, Y., MA, J., HUANG, X, WEI, G., HANG, Q., HUANG, L., KANG, Z., 2010, Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction, *BMC Plant Biology*, 10:9.

WANG, X.J., TANG, C.L., ZHANG, G., LI, Y.C., WANG, C.F., LIU, B., QU, Z.P., ZHAO, J., HAN, Q.M., HUANG, L.L., CHEN, X.M., KANG, Z.S., 2009, cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, *BMC Genomics*, 10, 289.

WANG, Y., YANG, L.M., XU, H.B., LI, Q.F., MA, Z.Q., CHU, C.G., 2005, Differential proteomic analysis of proteins in wheat spikes induced by *Fusarium graminearum*, *Proteomics*, 5, 4496–4503.

WILLEKENS, H., CHAMNONGPOL, S., DAVEY, M., SSHRAUDNER, M., LANGEBARTELS, C., VANMONTAGU, M., INZE, D., VANCAMP, W., 1997, Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants, *EMBO Journal*, 16, 4806–4816.

WILM, M., SHEVCHENKO, A., HOUTHAEVE, T., BREIT, S., SCHWEIGERER, L., FOTSIS, T., MANN, M., 1996, Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry, *Nature*, 379, 466-469.

WOLOSIUK, R. A., BUCHANAN, B. B., 1977, Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts, *Nature*, 266, 565 – 567.

XINGQUAN, Z., CHANGYOU, W., ALI, M., HONG, Z., XINLUN, L., WEIYAN, L., WANQUAN, J., 2010, Profiling gene expression patterns of Stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) resistance gene in new wheat germplasm, *Pakistan Journal of Botany*, 42(6), 4253-4266.

Xu, H., HEATH, M. C., 1998, Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore derived infection of the cowpea rust fungus, *Plant Cell*, 10:, 585–597.

YAMAMOTO, S., NAKANO, T., SUZUKI, K. and SHINSHI, H., 2004, Elicitor induced activation of transcription via W box related cis acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1679, 279- 287.

YANG, T., POOVAIAH, B.W., 2003 ,Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants, *Trends in plant science*, 8(10), 505-512.



YOKI, K.C.B., SAMUEL, C.L.L., 2007, Proteomic studies on plant–pathogen interaction in compatible and incompatible systems, *Current Proteom*, 4, 141–156.

ZANGERL, A.R., HAMILTON, J.G., MILLER, T.J., CROFTS, A.R., OXBOROUGH, K., BERENBAUM, M.R., DELUCIA, E.H., 2002, Impact of folivory on photosynthesis is greater than the sum of its holes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 1088–1091.

ZENG, L. R., VEGA-SANCHEZ, M. E., ZHU, T., WANG, G. L., Ubiquitination mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions, *Cell Research*, 16, 413–426.

ZHANG, Y., XUA, S., DINGA, P., WANGD, D., CHENGD, Y.T., HEA, J., GAOA, M., XUD, F., LIA, Y., ZHUA, Z., LID, X., ZHANGA, Y., 2010, Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18220–18225.

ZHANG, S., KLESSIG, D. F., 1997, Salicylic acid activates a 48-kDa MAP kinase in tobacco, *Plant Cell*, 9, 809–824.

ZHOU, W., EUDES, F., LAROCHE, A., 2006, Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics*, 6, 4599–4609.

ZHOU, W., KOLB, F.L., RIECHERS, D.E., 2005, Identification of proteins induced or upregulated by *Fusarium* head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*), *Genome*, 48, 770–780.

ZHU, Q., DROGE-LASER, W., DIXON, R. A., LAMBS, C., 1996, Transcriptional activation of plant defense genes, *Current Opinion in Genetics & Development*, 1996, 6, 624-630.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında Trabzon'da doğdum. Liseyi 2004 yılında Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü, Biyoloji Öğretmenliği Programı'nda lisans eğitimime başladım. 2010 yılında lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladım.