



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AFİT VE ENDOSİMBİYOTİK BAKTERİ BUCHNERA ARASINDAKİ İLİŞKİYE
AZOT KAYNAĞININ ETKİSİ

GÜLAY OLCABEY ERGİN

Haziran 2019

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AFİT VE ENDOSİMBİYOTİK BAKTERİ BUCHNERA ARASINDAKİ İLİŞKİYE
AZOT KAYNAĞININ ETKİSİ

GÜLAY OLCABEY ERGİN

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK

Haziran 2019

Gülay OLCABEY ERGİN tarafından **Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK** danışmanlığında hazırlanan “**Afit ve endosimbiyotik bakteri Buchnera arasındaki ilişkiye azot kaynağının etkisi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Ana Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Servet ÖZCAN (Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri)

Üye : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK (Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde)

Üye : Prof. Dr. Gazi GÖRÜR (Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde)

Üye : Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ (Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde)

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Osman İBİŞ (Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri)

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

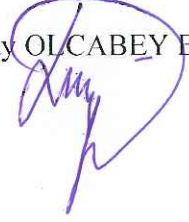
...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gülay OLCABEY ERGİN



ÖZET

AFİT VE ENDOSİMBİYOTİK BAKTERİ BUCHNERA ARASINDAKİ İLİŞKİYE AZOT KAYNAĞININ ETKİSİ

OLCABEY ERGİN, Gülay
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK

Haziran 2019, 87 sayfa

Bu çalışmada *Acyrtosiphon pisum*' un endosimbiontu *Buchnera aphidicola*'nın varlığının belirlenmesi, antibiyotik (Klortetrasiklin) endosimbionta etkisi ve farklı azot kaynaklarının afite ve konak bitkiye etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Antibiyotik uygulanan ve uygulanmayan konak bitkide, *Vicia faba*, kültüre alınan *A. pisum* örneklerinde endosimbiont varlığı PZR ile belirlenmiştir. Kısa süreli antibiyotik uygulamanın endosimbiontu elemine edemediği PZR ile gösterilmiştir. Farklı solüsyonların uygulanması sonucunda afitlerde morfolojik karaktere özgü etki olduğu belirlenmiştir. Sodyum nitrat uygulamasının anten uzunluğu, amonyum nitrat ile antibiyotik uygulamasının sifunkuli üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Uygulanan solüsyonların afitlerde stres koşullarında görülen bilateral gelişim bozukluğunu ve kanatlı birey sayısını artırdığı belirlenmiştir. Kullanılan solüsyonların bitkideki etkileri protein, prolin, fotosentetik pigment, fenolik bileşik ve antioksidan enzim aktivite tayinleriyle belirlenmiştir. Tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre toplam protein konsantrasyonlarının azaldığı, prolin konsantrasyonlarının arttığı belirlenmiştir. Bitkinin bu ilişkideki rolünün dahil edildiği ilk çalışma ile farklı azot kaynaklarının bitkide strese neden olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle özellikle afitlerle mücadeleyi etkin kılabilmek için bu ilişki daha detaylı çalışılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: *Acyrtosiphon pisum*, *Buchnera aphidicola*, Klortetrasiklin, azot kaynağı, stres

SUMMARY

EFFECT OF NITROGEN SOURCE ON RELATIONSHIP BETWEEN APHID AND ENDOSYMBIOTIC BACTERIUM BUCHNERA

OLCABEY ERGİN, Gülay
Nigde Ömer Halisdemir University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK

June 2019, 87 pages

In this study, it was aimed to determine the presence of endosymbiont of *Acyrtosiphon pisum*, *Buchnera aphidicola*, effect of antibiotic (Chlortetracycline) on endosymbiont and impacts of different nitrogen sources on aphid and host plant. Presence of endosymbiont was determined by PCR in both cultured *A. pisum* samples on the host plant with and without antibiotics, *Vicia faba*. It has been shown by PCR that short-term antibiotic application cannot eliminate endosymbiont. It was determined that application of different solutions had character-specific morphological effect in aphids. Sodium nitrate application influenced anten length and antibiotic with ammonium nitrate application affected siphunculi length. It was observed that applied solutions increased bilateral developmental noise and number of winged individuals under stress in aphids. Effects of solutions on plant were detected by protein, proline, photosynthetic pigment, phenolic compound and antioxidant enzyme activity. It was shown that total protein concentrations decreased while proline concentrations increased in all application groups compared to control. The first study that included the role of the plant in this relationship showed that different nitrogen sources might cause stress in the plant. Therefore, this relationship should be studied in more detail in order to make efficient control against aphids.

Keywords: *Acyrtosiphon pisum*, *Buchnera aphidicola*, Chlortetracycline, nitrogen source, stress

ÖN SÖZ

Doktora tez çalışmamın planlanması, araştırılması, yürütülmesinde ilgisini, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu zorlu tez sürecinde kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve ilgiyle elinden gelenden fazlasını sunan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren kıymetli hocam Prof. Dr. Gazi GÖRÜR'e teşekkür ederim. Bu çalışmayı hazırlarken geçirdiğim süreçte değerli zamanlarını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan kıymetli hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Osman İBİŞ' e, Prof. Dr. Servet ÖZCAN' a, Prof. Dr. Coşkun TEZ' e ve GEN-KÖK çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan başta Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ, Doç. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL, Doç. Dr. Cemil İŞLEK, Dr. Öğretim Üyesi Özhan ŞENOL olmak üzere Biyoloji ve Biyoteknoloji bölümündeki bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince manevi desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Öğretim Görevlisi Elif ve Şükrü CANPOLAT'a, Cihan DÜŞGÜN, Zeynep DÜZELTEN BALLI, Hüseyin TÜRKER'e sonsuz teşekkürler.

Sadece tez çalışmamda değil hayatım boyunca maddi ve manevi koruyuculuğumu üstlenen annem ve babam Hatice-Hikmet OLCABEY ve Meral-Erdal ERGİN' e, kardeşlerime ve bütün aileme teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca tüm zorlukları benimle göğüsleyen, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, hayattaki en büyük şansım hayat arkadaşım Erhan ERGİN' e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamı biricik oğlum Doruk ERGİN' e ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	3
2.1 Endosimbiyozis	3
2.1.1 Afıt bakterisi arasındaki endosimbiyotik ilişki	3
2.1.1.1 Birincil simbiyont <i>Buchnera aphidicola</i>	4
2.1.1.2 Afıtlar ve ikincil simbiyontlar	8
2.2 Canlılarda Stresin Etkileri	10
2.2.1 Bitkilerde stres ve strese yol açan faktörler	10
2.2.2 Afıtlarda stres	12
2.3 Afıtlarda Morfoloji ve Morfometrik Çalışmalar	13
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT	20
3.1 Örneklerin Toplanması	20
3.2 Örneklerin Preparasyonu ve Teşhisi	21
3.2.1 Preparasyon	21
3.2.2 Örneklerin teşhisi	21
3.3 Deneme Setinin Hazırlanması	22
3.4 Moleküler Çalışmalar	24
3.4.1 Genomik DNA izolasyonu	24
3.4.2 Primerler	25
3.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	25
3.4.4 Agaroz jelin hazırlanması	26
3.4.5 PZR ürünlerinin agaroz jel üzerinde yürütülmesi ve görüntülenmesi	27
3.5 Morfometrik Analizler ve Kullanılan Karakterler	27

3.6 <i>Vicia faba</i> Bitkisi ile Yapılan Analizler.....	29
3.6.1 Fotosentetik pigment miktarının belirlenmesi.....	29
3.6.2 Prolin konsantrasyonunun belirlenmesi.....	30
3.6.3 Toplam protein miktarının belirlenmesi	31
3.6.4 Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi	32
3.6.5 Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	33
3.6.5.1 Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	33
3.6.5.2 Katalaz (CAT) enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	34
3.7 İstatistik Değerlendirme.....	35
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1 Moleküler Bulgular.....	36
4.2 Morfometrik Bulgular.....	39
4.2.1 Temel morfolojik karakterler.....	39
4.2.2 Bilateral karakterlerde gelişim bozukluğu (FA)	44
4.3 Farklı Azot Kaynaklarının <i>Vicia faba</i> Bitkisinin İçeriğine Etkisi	46
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	63
5.1 Azot Kaynaklarının <i>Buchnera</i> 'ya Etkisi.....	63
5.2 Azot Kaynaklarının Bitki İçeriğine Etkisi	63
5.3 Azot Kaynaklarının Afit Morfolojisine Etkisi	64
KAYNAKLAR	65
EKLER.....	78
ÖZ GEÇMİŞ	86
TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bitkilerde biyotik ve abiyotik çevresel stres etmenleri	10
Çizelge 3.1. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik kullanılarak hazırlanan solüsyonlar ve içerikleri	23
Çizelge 3.2. PZR çalışmasında kullanılan primerler ve erime sıcaklıkları.....	25
Çizelge 3.3. PZR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları	26
Çizelge 3.4. PZR döngü sayısı ve sıcaklıkları	26
Çizelge 4.1. Sekans analizinden elde edilen nükleotid dizilerinin FASTA uzantısı	37
Çizelge 4.2. <i>A. pisum</i> popülasyonunun morfolojik karakterleri üzerine farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisi	40
Çizelge 4.3. <i>A. pisum</i> popülasyonunun morfolojik karakterleri üzerine farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi	41
Çizelge 4.4. <i>V. faba</i> bitkisinde yapılan analizlerde farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisi.....	49
Çizelge 4.5. <i>V. faba</i> bitkisinin fenolik bileşik miktarı üzerine farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisi.....	50
Çizelge 4.6. <i>Vicia faba</i> bitkisinin fotosentetik pigment miktarına farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi	50
Çizelge 4.7. <i>Vicia faba</i> bitkisinin prolin ve protein konsantrasyonlarına farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi	54
Çizelge 4.8. <i>Vicia faba</i> bitkisinin SOD enzim aktivitesinde farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi.....	57
Çizelge 4.9. <i>Vicia faba</i> bitkisinin CAT enzim aktivitesinde farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi.....	58
Çizelge 4.10. <i>V. faba</i> bitkisinin fenolik bileşik miktarı üzerine farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Buchnera</i> 'nın afit metabolizmasındaki fonksiyonu.....	7
Şekil 2.2. Kanatsız <i>A. pisum</i> afit türünün morfolojik kısımları	14
Şekil 2.3. <i>A. pisum</i> 'un anten segmentleri (1-4 segment)	15
Şekil 2.4. <i>A. pisum</i> 'un rostrum IV+V segmentleri	16
Şekil 2.5. <i>A. pisum</i> 'un arka bacak tarsus segmentlerinin görünümü	17
Şekil 2.6. <i>A. pisum</i> 'da sifunkuli ve kaudanın genel görünümü	17
Şekil 2.7. Kanatlı (a) ve kanatsız (b) <i>Acyrtosiphon pisum</i> türünün genel görünümü ...	18
Şekil 3.1. <i>A. pisum</i> bireylerinin örneklenmesi (Niğde, Çiftlik, Murtaza köyü).....	20
Şekil 3.2. <i>Vicia faba</i> fidelerinin genel görünümü	22
Şekil 3.3. Deney düzeneğinin tek başına (a) ve genel (b) görünümü	23
Şekil 3.4. <i>Vicia faba</i> bitkilerinin fotosentetik pigment miktarı ölçümüne hazırlanması	29
Şekil 3.5. <i>Vicia faba</i> bitkilerinin ekstraksiyonu.....	30
Şekil 3.6. Prolin miktarı ölçümü sırasında renk değişimi.....	31
Şekil 4.1. Buch16S1 primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri	36
Şekil 4.2. Sekansların NCBI gen bankası BLAST analizi verileri	37
Şekil 4.3. <i>B. aphidicola</i> 'nın karşılaştırmalı genom analizi.....	38
Şekil 4.4. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının <i>A. pisum</i> popülasyonlarının anten VI. segmentinin uç kısmının uzunluğu (PT) üzerine etkisi	42
Şekil 4.5. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının <i>A. pisum</i> popülasyonlarının sifunkuli uzunluğu (SIP) üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.6. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının <i>A. pisum</i> popülasyonlarının anten III. segment uzunluğu (ANTIII) üzerine etkisi	43
Şekil 4.7. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının <i>A. pisum</i> bireylerinde sifunkulinin gelişim bozukluğu üzerine etkisi	44
Şekil 4.8. ACC (NH ₄ Cl+Antibiyotik) uygulaması yapılan bitkilerden örneklenen <i>A.</i> <i>pisum</i> bireylerinde SIP gelişim bozukluğu	45
Şekil 4.9. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının <i>A. pisum</i> bireylerinde Anten VI. segmentinin uç kısmının (PT) gelişim bozukluğuna etkisi.....	45

Şekil 4.10. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının <i>A. pisum</i> popülasyonlarının kanatlı birey oranı üzerine etkisi	46
Şekil 4.11. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının klorofil-a miktarları	51
Şekil 4.12. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının klorofil-b miktarları	52
Şekil 4.13. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının toplam klorofil miktarları	52
Şekil 4.14. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının karotenoid miktarları	53
Şekil 4.15. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının prolin miktarları	55
Şekil 4.16. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının toplam protein miktarları	56
Şekil 4.17. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının SOD enzim aktivitesi	59
Şekil 4.18. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının CAT enzim aktivitesi	59
Şekil 4.19. <i>Vicia faba</i> bitkisi yapraklarının toplam fenolik bileşik miktarı	61



SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
A	Adenin
C	Sitozin
G	Guanin
T	Timin
U	Urasil
°C	Santigrad derece
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Kısaltmalar	Açıklama
Bç	Baz Çifti
cDNA	Komplementer DNA
dH ₂ O	Distile Su
dNTP	Di-Nükleotid Tri-Fosfat
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Asit
Kb	Kilobaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Real Time PCR
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
TAE	Tris, Glasial Asetik Asit, EDTA
UV	Ultraviyole

BÖLÜM I

GİRİŞ

Halk arasında yaprak biti olarak adlandırılan afitler otsu ve odunsu pek çok bitkiyi konak olarak kullanmaktadır. Küresel ısınma ile birlikte bitkiler üzerinde seksüel ve aseksüel olarak üreyerek popülasyon büyüklüklerini artırdığı ve bu süreçte bitkilere büyük ölçüde zarar verdiği bilinmektedir. Ayrıca belirli şartlar altında afitlerin konak bitki değiştirebildiği ve zararın büyüklüğünü artırabildiği de bilinmektedir. Bu bağlamda afitlerle mücadelede uygun stratejiler bulabilmek için afit metabolizmasının iyi bilinmesi gerektiği ve özellikle bu metabolizmanın işleyişinde endosimbiyotik bakteri *Buchnera*'nın foksiyonunun tam olarak belirlenmesi biyolojik mücadelede kullanım olanağını artıracaktır.

Afitlerin yüksek adaptasyon yetenekleri ve çevre şartlarının uygun olduğu her ortamda yaşayabilme ve çok hızlı çoğalabilme yeteneklerinden dolayı yakın gelecekte bitkilerin en önemli zararlılarından biri olma potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Bu canlı grubu ile mücadelede etkin ve başarılı olabilmek için afitlere ait pek çok özelliğin bilinmesi ve aydınlatılması gerekmektedir. Afitler bitki öz suyu ile beslenen, birçok bitkiyi konak olarak seçebilen, tarımsal öneme sahip böceklerdir. Afit sistematigi ve ekolojisi ile ilgili çalışmalarda beslenme ve adaptasyonla ilgili olarak hemen hemen bütün afitlerin endosimbiyont bakteriler ile ilişki içerisinde olduğu ve birincil simbiyotik ilişkiler kurduğu tespit edilmiştir. Afitlerin çoğu birincil endosimbiyont olarak *Buchnera aphidicola* ile sıkı bir mutualistik ilişki içerisinde. Konak bitkinin afite çeşitli besinleri sağladığı bilinmekte olup, ayrıca simbiyotik ilişki kurduğu birincil endosimbiyont olan *Buchnera* afit tarafından bitki öz suyundan alınan esansiyel olmayan amino asitleri esansiyel amino asitlere dönüştürdüğü, afitin konağından aldığı azotun az ya da çok olmasının afitin gelişmesi üzerinde farklı etkilerinin olduğu da belirtilmektedir. Diğer bir deyişle, afitin bitki öz suyundan aldığı azot, endosimbiyontlar tarafından kullanılarak afitin bitkiden yeterince alamadığı bazı amino asitlerin sentezinde kullandığı ayrıca endosimbiyont bakterinin afitlerin atıkları olarak ifade edilen amonyumu amino asitlere de dönüştürdüğü ifade edilmektedir. Bu çalışmada azot kaynağının amino asit sentezini ne ölçüde etkilediği, bitkinin, afitin ve simbiyont içermeyen afitin (aposimbiyontların) bu durumdan nasıl etkilendiği belirlenmeye

çalışılmıştır. Çünkü daha önce yapılmış pek çok çalışmada birincil simbiyontların (örneğin *Buchnera*’nın), bitki özsuyunda bulunmayan aminoasitleri, bazı vitaminleri ve faydalı pek çok bileşiği konağı olan böceklere sağladığıyla ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazılarında antibiyotik varlığında *Buchnera*’nın olumsuz şekilde etkilenecek fonksiyonunu yerine getiremediğinden bahsedilmiş ve afitten uzaklaştırılabildiği düşünülmüştür. Antibiyotik uygulaması sonucu elde edilen aposimbiyont bireylerde esansiyel olmayan amino asit içeriği ve amonyum içeriğinin bu nedenle yüksek olduğu belirtilmiştir. Ancak *Buchnera* sayesinde esansiyel olmayan amino asitlerden ve amonyaktan esansiyel amino asitlerin sentezlendiği tam olarak kanıtlanmadığı belirtildiğinden daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu da ifade edilmiştir.

Bu çalışmada, konak olarak kullanılan *Vicia faba* bitkisi üzerinde gelişen afitlere ve afitteki *Buchnera* varlığına azot kaynaklarının ve antibiyotik uygulamasının etkisi araştırılmıştır. *Buchnera*’yı afitten uzaklaştırmak için antibiyotik içeren ve içermeyen farklı azot kaynakları çözelti halinde bitkiye verilmiş ve bu bitkiler üzerinde kültüre edilen afitlerde endosimbiyont varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. Azot kaynaklarının konak bitkide fotosentetik pigment miktarına (klorofil a, klorofil b, karoten), fenolik bileşiklerin miktarına, protein ve prolin içeriğine etkisi ayrıca antioksidan enzim içeriklerine olan etkisi de belirlenmiştir. Bu çalışmada konak bitkiye uygulanan farklı azot kaynaklarının afitin gelişmesine olan etkisini de tespit etmek amacıyla morfometrik çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışma ile sadece afit simbiyont ilişkisini çalışmanın yeterli olmadığı aynı zamanda konak bitki üzerinde de çalışmak gerektiği ortaya konulmuştur. Çalışma sonuçlarına bakıldığında bitkiye uygulanan azotun bitkide farklı derecelerde strese neden olduğu ayrıca bitki öz suyundan beslenen afitlerde de stres oluşturabildiği belirlenmiş olup, sadece *Buchnera*’ya dönük çalışmaların afitle mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi açısından yeterli olamayacağı, konak bitkide olası değişikliklerin de göz ardı edilmemesi gerektiği ortaya konulmuştur.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Endosimbiyozis

Simbiyozis, canlı organizmaların evrimsel çeşitliliğinde oldukça önemli rolü olan, iki ya da daha fazla türe ait organizma arasındaki ekolojik ilişkidir. Böcekler çoğunlukla yeryüzünde çok çeşitli ve en başarılı hayvanlar olmalarını sağlayan bakterilerle uzun vadeli ve istikrarlı ekolojik ilişkiler kurarlar. Böceklerdeki bakteriyel endosimbiyontların (hücre içi simbiyoz yapan bakterilerin) çoğu bağımsız olarak kültüre alınamaz ve zorunlu endosimbiyont olarak konak canlıda çok az sayıda bulunabilir (Oliver vd., 2010). Endosimbiyontların yavaş büyümeleri, yaşam tarzları, belirli konakçı metabolitlerine olan gereksinimleri, bağımsızlıklarını azaltan genlerin kaybı veya bu genlerin inaktivasyonu nedeniyle yetiştirilmesi zor olabilir (Pontes ve Dale, 2006). Her ne kadar bazı bakteriler parazit olsalar ve konağının yaşam kalitesini azaltsalar da çoğu simbiyotik bakteri konağına farklı şekillerde yarar sağlar. Genel olarak, simbiyontlar konağın gelişme, beslenme, üreme, termal tolerans, savunma ve bağışıklık davranışları üzerinde etkilidir (Dale ve Moran, 2006; Dunbar vd., 2007; Tsuchida vd., 2011).

2.1.1 Afıt bakteri arasındaki endosimbiyotik ilişki

Hemen hemen bütün afıtlar endosimbiyont bakterilerle ilişki içerisindedir. Bu ilişki genellikle beslenme, üreme, savunma ve bağışıklık davranışları üzerine kurulmuştur. Endosimbiyont bakteriler, birincil yada zorunlu (*Buchnera aphidicola*) ve ikincil yada fakültatif (*Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*, *Erwinia aphidicola*, *Serratia symbiotica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Wolbachia pipientis*, *Rickettsiella sp.*, *Rickettsia sp.*, *Spiroplasma sp.*, *Arsenophonus sp.*, *Photorhabdus sp.*, *Xenorhabdus sp.*) olmak üzere iki kısımda incelenir (Oliver vd., 2010).

2.1.1.1 Birincil simbiyont *Buchnera aphidicola*

Afitlerin çoğu birincil endosimbiyont olan *Buchnera aphidicola* ile sıkı bir mutualistik ilişki içerisinde. *Buchnera aphidicola*'nın 16S rRNA analizlerinde, Proteobacteria'nın gama 3 alt grubunun içerisinde farklı bir soy olduğu belirtilmekteyken Munson vd. (1991), yaptıkları çalışmada birincil endosimbiyontların *Buchnera* cinsi ve *Buchnera aphidicola* türünün yeni bir tür olarak soyağacında yer alması gerektiği belirtilmiştir. *Enterobacteriaceae* ile ilişkili olduğu bilinen *B. aphidicola*, 2,5-4 µm çapında bir bakteridir. Ayrıca yakın ilişkili olduğu Enterobacteriaceae üyelerinin temel özelliklerinden biri olan gram-negatif hücre duvarına sahiptir. Ancak diğer gram negatif bakterilerin çoğundan farklı olarak *Buchnera*, dış zarı için lipopolisakkaritlerin üretiminden sorumlu genlerden yoksundur (Skaljac, 2016). Ayrıca 160-280 milyon yıl öncesine dayanan bu afit-*Buchnera* evrimsel ilişkisi süresince *Buchnera* anaerobik solunum için gerekli genlerini, amino şekerlerin, yağ asitlerinin, fosfolipidlerin ve kompleks karbonhidratların sentezinden sorumlu genlerini kaybetmiştir. Triptofan gibi bazı amino asitlerin sürekli olarak fazla üretilmesine imkan veren bazı regülatör faktörlerini de kaybetmiştir. Rifampisin uygulaması ile elde edilen aposimbiyont *Acyrtosiphon pisum*'un amino asit profilleri incelenmiş ve aposimbiyontların embriyolarındaki aromatik amino asit olan fenilalanin ve triptofan konsantrasyonlarının çok düşük olduğu ve bu amino asitlerin aposimbiyont afitlerin embriyo gelişmesini sınırlandırabileceği belirtilmiştir (Douglas, 1996).

Vertikal yolla taşınan bakteriyel simbiyontlar ya konağının yaşam şansını artırır ya da kendi aktarımına fayda sağlayacak şekilde konağının üremesini manipüle edebilir (Skaljac, 2016). Bazı afit familyaları ve onların birincil endosimbiyontu olan *Buchnera* ile filogeniye dayalı bir çalışmada, 4 farklı afit familyasından endosimbiyont *Buchnera*'nın 16S rDNA'ya dayalı filogenisi ile afit konaklarının morfolojiye dayalı filogenisinin tamamen uyum gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmanın moleküler verilerine göre, Lachnidae ve Aphididae familyalarının daha yakın zamanlarda evrimleşen kardeş gruplar olduğu düşünülmektedir. Afidler ve endosimbiyontlarının paralel olarak evrimleştiği ve endosimbiyontların vertikal yolla anneden yavrulara aktarıldığı bildirilmiştir (Martinez-Torres vd., 2001).

Birincil endosimbiont *B. aphidicola* tipik olarak konağının vücut boşluğunda bulunan misetosit ya da bakteriosit adı verilen özelleşmiş hücreler içerisinde bulunur (Sasaki ve Ishikawa, 1995). Ergin bir afit tahmini olarak $5,6 \times 10^6$ *Buchnera* hücresi taşıyabilir. Ancak endosimbiont bakteri sayısı konağı olan afitin performansı, mevsimsel değişiklikler, sıcaklık değişiklikleri ve afitin beslendiği konak bitki gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir (Yao, 2019). Afit-*Buchnera* ilişkisine sıcaklığın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, farklı sıcaklıklarda yetiştirilen *Vicia faba* üzerinde *Acyrtosiphon pisum* bireylerindeki *Buchnera* popülasyonunun yoğunluğunu belirlemek için kantitatif hibridizasyon için DNA prob (GroESL) kullanılmıştır. Ergin bir afitin yaklaşık 5.6×10^6 adet *Buchnera* hücresi taşıdığı belirtilmiş olup (Baumann ve Baumann, 1994), 15°C ve 25°C arasındaki sıcaklıklarda afitlerin bakteriyel yoğunluğunun 1.3×10^7 den 2.0×10^7 e kadar arttığı, ayrıca 37°C ve -10°C' de endosimbiont ilişkisinin bozulduğu ayrıca afitlerdeki endosimbiont bakteri yoğunluğunun böceğin gelişme aşamasına göre değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir (Humphreys ve Douglas, 1997).

Buchnera'nın 641 kb uzunluğunda, birçok zorunlu amino asidin biyosentezinden sorumlu genleri kodlayan AT nükleotid çifti açısından zengin bir genomu sahip olduğu ancak genomunun hücre yüzey bileşenlerinin biyosentezinden sorumlu genlerle hücresel savunmada görevli genler ve regülatör genlerden yoksun olduğu belirtilmiştir (Shigenobu vd., 2000). Bezelye afiti *Acyrtosiphon pisum*'un endosimbiontu olan *Buchnera*'nın genomu bazı restriksiyon enzimleri kullanılarak PFGE (Pulse-Field Gel Electrophoresis) ile 657 kb büyüklüğünde halkasal bir DNA molekülü olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca *Buchnera*'nın genom haritası, *Escherichia coli* ve *Haemophilus influenzae*'nin genom haritası ile karşılaştırılmış; *Buchnera*'nın *E. coli*'ye daha benzer olduğu belirtilmiştir (Charles ve Ishikawa, 1999). Bir başka çalışmada, *Buchnera*'nın genom büyüklüğünü belirlemek için, 5 afit familyasından elde edilen 9 farklı *Buchnera* kromozomu PFGE ile analiz edilmiş ve fiziksel haritası çıkartılmıştır. Analiz edilen *Buchnera* türlerinde genom büyüklüğünün korunmayıp değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Bazı türlerde *Buchnera* genom büyüklüğünün 450 kb' e kadar düştüğü bildirilmiştir (Gill vd., 2002).

Böceklerin çok sayıda amino asidi sentezleyemediği, dolayısıyla klortetrasiklin antibiyotiği ile endosimbiontun uzaklaştırıldığı ve bu nedenle triptofan

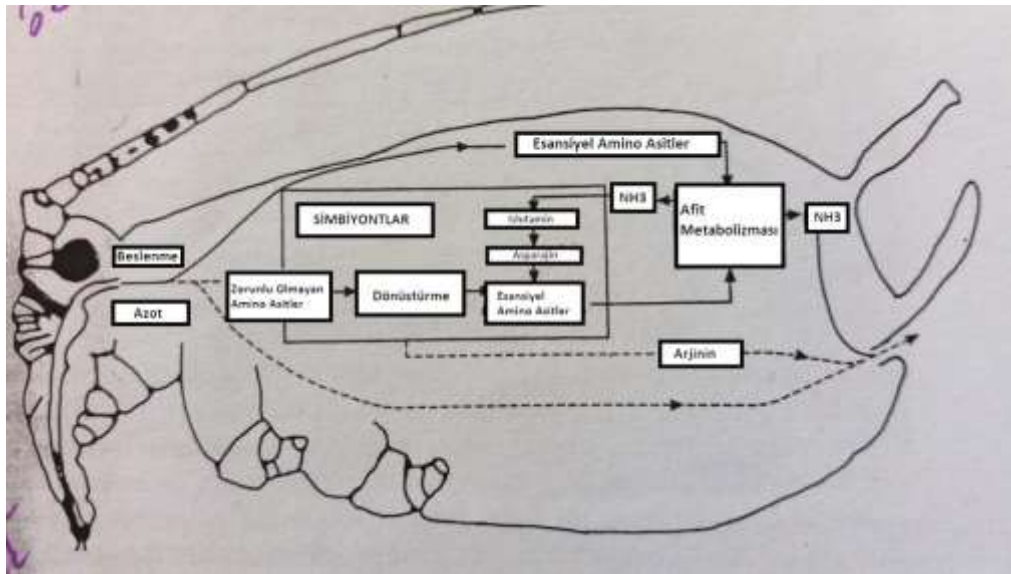
sentezleyemediği ileri sürülen afitin triptofan içermeyen bir diyetle beslendiğinde gelişmesini devam ettiremediği ifade edilmiştir (Douglas ve Prosser, 1992). Machado-Assefh vd. (2015), yaptıkları çalışmada *Buchnera aphidicola* ile mutualistik ilişki içerisinde olan afit türü *Myzus persicae* rifampisin antibiyotiği ile aposimbiyont hale getirilmiş ve bu uygulamanın afitlerin beslenme davranışı ile tükrük salgısındaki genlerin ekspresyonuna etkisini belirlemeye çalışmışlardır. *Buchnera aphidicola*'nın zorunlu amino asit ve vitaminleri sentezlemek dışında bitki- böcek etkileşimine de katkısı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *M. persicae*'nin tükrük salgısında konak bitkinin metabolizmasında görevli bakteriyel proteinlere rastlanmıştır. Aposimbiyotik afitlerin beslenme davranışlarında farklılıklar, afitlerin konak bitkiye stiletlerini penetre etme süresince bazı problemler ve konak bitkinin afitler tarafından tanınmasında gecikmeler görülmüştür.

Buhnera' nın afit metabolizmasına etkisi

Endosimbiyont bakteri *Buchnera*'nın konağının bitki öz suyundan aldığı esansiyel olmayan amino asitleri kullanarak fenilalanin ve triptofan gibi aromatik esansiyel amino asitlerin sentezinde rol oynadığı Machado-Assefh vd. (2015) tarafından bildirilmektedir (Şekil 2.1.). Afetlerin beslenmesinde endosimbiyontların rolü ile ilgili çalışmalar, sentetik besi ortamlarının geliştirilmesi, klortetrasiklin antibiyotiğinin kullanımı ve aposimbiyont afitler üretmek için ısı şok uygulamasının geliştirilmesiyle daha da kolaylaşmıştır (Dixon, 1998). Afet-endosimbiyont ilişkisinde bakterilerin etkisinin çalışılabilmesi için afitlere farklı dozlarda ve farklı şekillerde antibiyotik uygulamaları yapılarak aposimbiyont hale getirilmeye çalışılmaktadır.

İlk olarak 1945 yılında Yellapragada Subbarow ve Benjamin Minge Duggar tarafından tanımlanmış olan klortetrasiklin, tetrasiklin antibiyotikler grubu içerisinde yer alır. Bir toprak numunesinden kültüre aldıkları *Streptomyces aureofaciens* türü bakteriden izole etmişlerdir. Molekül formülü $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$ olan klortetrasiklin, bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek bakterilerin gelişmesini ve üremesini olumsuz etkileyen tetrasiklin grubunda geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Liaoa vd., 2017). Wilkinson (1998) yaptığı çalışmada *Acyrtosiphon pisum* ve *Buchnera* arasındaki simbiyotik ilişkide, klortetrasiklin ve rifampisin antibiyotik uygulamasının etkisini tanımlanmaya çalışmıştır. Antibiyotik uygulaması ile elde edilen aposimbiyontların önemli metabolik

düzenlemeler gerçekleştirdiği, ancak bu uygulamanın afitlerin mitokondrilerine etki etmediğini bildirmiştir. Antibiyotik uygulamasının afitlerdeki ozmoregülasyona, beslenme oranına, bitki dokusuna penetre olma kabiliyetine ve amino asitlerin asimilasyonuna etki etmediği belirlenmiştir. Antibiyotik uygulamanın afitlerde balsı madde miktarı ve yapısına etkisine ilişkin çeşitli çalışmalar da yapılmıştır. Bezelye afiti *Acyrtosiphon pisum*' un konak bitki üzerinde balsı madde üretimi EPG (Electrical Penetration Graph) tekniği ile gözlemlenmeye çalışılmıştır. Doğduktan sonraki ilk 5 gün klortetrasiklin antibiyotiği uygulanan *Vicia faba* bitkisi üzerinde gelişen afitlerin balsı madde miktarı, balsı maddenin tanecik büyüklüğü incelenmiştir. Genel olarak aposimbiyotik afitlerin balsı madde tanecik boyutunun endosimbiyotik bakteri içeren afitlere göre daha küçük olduğu sonucuna varılmıştır (Wilkinson ve Douglas, 1995a). Bitki üzerindeki ve hazır besiyerindeki afitlere iki günlük rifampisin uygulamasının yapıldığı bir çalışmada, aposimbiyotik afit dokusundaki ve balsı maddesindeki glutamin seviyesi, aminoasit içeriği, amonyum miktarı ve glutamin sentetaz aktivitesi endosimbiyont içeren afitlerinki ile karşılaştırılmıştır. Afit dokusunda ve balsı maddede yapılan analizlerde; aposimbiyont afitlerde amino asit, glutamin ve amonyum içeriği ile glutamin sentetaz aktivitesinin endosimbiyont içeren afitlere kıyasla yaklaşık iki kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Afit besiyerine amonyum katılmasına karşın endosimbiyont içeren afitlerde azot kaynağının tam olarak ne olduğunun belirlenemediği ifade edilmiştir (Wilkinson ve Douglas, 1995b).



Şekil 2.1. *Buchnera*'nın afit metabolizmasındaki fonksiyonu (Dixon, 1998)

Buchnera'nın riboflavin (B2 vitamini) sentaz kompleksinin, sadece simbiyotik ilişkinin sürekli olduğu ve bu ilişkinin genç konakta iyi bir şekilde kurulduğu durumlarda aktif olarak çalıştığı ifade edildiği bir çalışmada, "Differential cDNA display" ve kantitatif RT-PZR teknikleri kullanılarak, kimyasal olarak tanımlanmış diyetler ile riboflavinin endosimbiyont içeren afitlerin ve aposimbiyotik afitlerin performansına etkisi ortaya konulmuştur. Diyet riboflavinin aposimbiyotik afitlerin performansını artırdığı ve bu afitler için gerekli olduğu, genç endosimbiyont içeren afitlere zararlı olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre, genç endosimbiyont içeren afitlerin riboflavin ihtiyacını *Buchnera*'dan karşıladıkları ifade edilmiştir (Güz vd., 2015; Nakabachi ve Ishikawa, 1999).

2.1.1.2 Afidler ve ikincil simbiyontlar

Afitler ikincil simbiyontlar olarak bilinen fakültatif simbiyontlar da bulundurabilir. Fakültatif simbiyontlar zorunlu değildir ancak oldukça önemli görevler üstlendikleri bildirilmektedir. Bu simbiyontların (*Serratia*, *Hamiltonella*, *Regiella* vs...) konağını predatörlere (parazitik eşek arıları) karşı koruma, biyotik ve abiyotik faktörlere (sıcaklık stresi) karşı konak direncinin geliştirilmesi, beslenme ve vücut renginin farklılaştırılmasında önemli bir role sahip olduğu ifade edilmektedir (Koga vd., 2003; Brinza vd., 2009; Zhang vd., 2015). Koga vd. (2003), *Vicia faba* bitkisi üzerinde geliştirilen *Acyrtosiphon pisum* üyelerinde *Buchnera* ve PASS'ın (Pea Aphid Secondary Symbiont) birbirleriyle olan etkileşimleri ve afit üreme-gelişmesine etkisini çalışmışlardır. *Buchnera*'nın eliminasyonu sonucu, PASS konağının hayatta kalmasına ve üremesine imkan vererek birincil endosimbiyont *Buchnera*'nın yerini almaktadır. Diğer taraftan PASS'ın *Buchnera*'yı baskılayarak, afitin de performansını olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Afidler fakültatif endosimbiyontları ile yapılan bir başka çalışmada, endosimbiyontların konağına farklı ekolojik faydalar sağladığı belirtilmiş olup, Enterobacteriaceae üyesi X-tip bir bakterinin, afitleri fungal patojen *Pandora neoaphidis*'e karşı koruduğunu ve parazitoid *Aphidius ervi*'ye olan direncini artırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca X-tip bakterinin, afitin sıcaklık stresine karşı verdiği yanıtı da etkilediğini bildirmişlerdir (Heyworth ve Ferrari, 2015). Burke vd. (2009), çoğu afit türünün farklı rolleri üstlenen endosimbiyont bakteri bulundurduğuna dair yaptıkları çalışmada 51 Lachninae afit alt familyasına ait fakültatif simbiyont olan *Serratia symbiotica* ile filogenetik analizler gerçekleştirmişler, simbiyontların

dağılımında, morfolojilerinde ve fonksiyonlarında bazı farklılıklar gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu fakültatif endosimbiyont bakterilerin konağını ısı stresine karşı koruduğu ve afit beslenmesinde de potansiyel olarak rol aldığını belirtmişlerdir. Jousselelin vd. (2016), afitlerle ilişkili endosimbiyont bakterileri araştırarak 16S rRNA gen sekanslarının kullanıldığı bir çalışmada, *Cinara* afit türlerinde *Buchnera aphidicola* birincil endosimbiyontundan sonra en çok görülen endosimbiyont bakterinin *Serratia symbiotica* olduğu belirlemişlerdir. Ayrıca *Erwinia* ve *Sodalis* ile akraba bir bakteri ile yeni bir simbiyotik ilişkinin olabileceği ifade edilmiştir. Bunlara ek olarak, *Hamiltonella defensa* simbiyontunun afitleri parazitik *Aphidius ervi*' ye karşı koruyan lizojenik bir bakteriyofaj içerdiğine, *Regiella insecticola*' nın da fungal patojene karşı direnç sağladığını da belirtmişlerdir.

İkincil simbiyontlar bireyler arasında ve türler arasında vertikal veya horizontal yolla aktarılabilir (Russel vd., 2003). İkincil simbiyontlar, birincil endosimbiyontlar gibi özelleşmiş hücre gruplarında bulunmazlar. Bunun yerine genellikle ikincil bakteriosit hücrelerinde, kılıf hücrelerinde ve hemolimfde lokalize olmuşlardır. Kılıf hücreleri ise birincil bakteriosit hücrelerinin etrafında bulunan küçük düz hücrelerdir (Moran vd., 2005). Örneğin *Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica*, *Regiella insecticola* ve *Rickettsiella* sekonder bakteriyositlerin ve kılıf hücrelerinin sitoplazmasında yerleşirken *A. pisum*' un hemolimfde de bulunurlar (Fukatsu vd., 2000; Moran vd., 2005; Tsuchida vd., 2005).

Yapılan çalışmalarda *Buchnera* gibi birincil endosimbiyontların elemine olduğu koşullarda ikincil simbiyontların birincil endosimbiyontlar gibi canlıya destek olduğu görülmüştür. Dolayısıyla stres koşullarında birincil endosimbiyontlar inaktive edildiğinde koşullara adapte olabilen ikincil simbiyontların canlıya destek olabildiği belirtilmektedir (Koga vd., 2003). Sadece endosimbiyontlar afitlerin çevreye direncini ve adaptasyonunu değil aynı zamanda afitler de stres koşullarına karşı buldukları konağın direnç mekanizmalarını harekete geçirmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda afit istilasının bitkinin böcek direncini artırdığı, bitkide adeta bir aşı etkisi oluşturduğu tespit edilmiştir (Smith ve Chuang, 2014; Coppola vd., 2018).

2.2 Canlılarda Stresin Etkileri

Biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisiyle canlılarda ortaya çıkan değişimlere stres denir. Canlının yaşamını sürdürebilmesi için iç ortamının dengede olması ve çevreye uyum sağlaması gerekmektedir. İç ve dış ortamdaki değişikliklere karşı birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bu savunma mekanizmaları sayesinde canlı yaşamını sürdürmeyi başarır. Çeşitli stres faktörleri canlılarda homeostazinin ve metabolizmanın değişmesine yol açar (Cengiz, 2001).

2.2.1 Bitkilerde stres ve strese yol açan faktörler

Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açmak suretiyle bitkilerde büyümeyi ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken üründe nitelik ve niceliğin yitmesine, bitkinin ve bitki organlarının yaşantısını yitirmesine neden olabilmektedir. Doğadaki çok çeşitli biyotik ve abiyotik çevre etmenleri bitkilerde strese neden olur (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Bitkilerde biyotik ve abiyotik çevresel stres etmenleri (Kacar vd., 2002)

ABİYOTİK ETMENLER		BİYOTİK ETMENLER
Fiziksel Etmenler	Kimyasal Etmenler	
Kuraklık	Hava kirliliği	Yabani bitkiler
Sıcaklık	Bitki besin elementleri	Böcekler
Radyasyon	Pestisitler	Hayvanlar
Su baskını	Toksinler	Hastalıklar
Mekanik etkiler	Tuzlar	Mikroorganizmalar
(Rüzgar, kar ve buz örtüsü)	Toprak çözeltisi pH' sı	(Virüs, bakteri ve mantarlar)

Bitkiler patojen saldırılarından kendilerini korumak için birçok savunma mekanizmasına sahiptir. Bu savunma mekanizmaları bazı patojenler için caydırıcı bir rol oynamasına karşın bazı patojenler için etkisiz kalmaktadır. Bunun sonucunda da hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bakteriler, funguslar, virüsler ve nematodlar gibi birçok organizma için besin kaynağı olan bitkiler, patojenlerden soyutlanamazlar fakat kaçınılmaz olan patojen saldırılarını algılamak ve karşı koymak için evrim sürecinde

uygun savunma stratejileri geliştirmişlerdir. Bitkiler patojen istilasına etkili bir biçimde durdurabilmek için yapılarında var olan fiziksel ve kimyasal engeller kadar, patojen atağı ile aktive olan, uyarılabilir savunma tepkilerini de kullanırlar. Bitkiler stres ile ya başa çıkabilmekte ya da o stres faktöründen uzaklaşmaktadırlar. Stres faktörleri yapısal ve metabolik hasarlara neden olmaktadır. Bu hasarlar geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir (Koç ve Üstün, 2008).

Çeşitli patojen ve predatör saldırılarında bitkiler üzerinde stres ve direnç mekanizmalarının uyarılmasıyla savunma mekanizmalarının çalıştırıldığı belirlenmiştir. Afit saldırısına dirençli bitkiler olduğu kadar, bazı afitlerin bitki direncini uyarabildiği de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda afit istilasının bitkilerde çeşitli metabolik değişiklikler oluşturarak örneğin stres hormonu salisilik asit ve jasmonik asit sentezini sağlayarak bitkinin ikincil istilalara karşı savunmasını artırdıkları tespit edilmiştir (Jaouannet vd., 2014; Smith ve Chuang, 2014; Coppola vd., 2018). Böcek ve patojen istilasının stres hormonları yanında bitkilerde çeşitli sekonder metabolit üretimini de artırdığı ve bu sekonder metabolitlerin bitkinin savunma sistemi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Buna karşı afitler ise tükrük bezlerinde bulunan çeşitli kimyasal ve enzimlerle bitkilerin savunma yanıtlarını hafifletmeye çalıştıkları tespit edilmiştir (Cheynier vd., 2013; Mugford vd., 2016; Thorpe vd., 2016; Wang vd., 2016).

Bitki besin elementleri

Bitkiler topraktan bazı inorganik maddeleri alarak organik bileşikler üretirler. Bitki gelişmesi için gerekli elementler makro ve mikro besin elementleri olmak üzere sınıflandırılır. Bu besin elementlerinin sınıflandırılmasında değişik kaynaklar arasında farklılıklar bulunmaktadır (Kacar vd., 2002). Genellikle makro besin elementleri azot, fosfor, kükürt, potasyum, kalsiyum ve magnezyum olarak kabul edilirken, mikro besin elementleri ise klor, bakır, demir, bor, çinko, molibden, mangan ve sodyum olarak kabul edilmektedir. Azot bitkiler için mutlak gerekli bir elementtir. Bitki azotu topraktan nitrat ve amonyum iyonları şeklinde alır. Bazı özel enzimlerle nitrat önce nitrite ardından amonyağa dönüşerek indirgenir. Oluşan amonyak yada amonyum amino asitlere, amidlere ve benzer bileşiklere özümленir. Ayrıca enzimlerin, bazı vitamin ve hormonların sentezinde de azot kullanılır. Mikro besin elementi olan klor fotosentez reaksiyonlarında fotoliz olayında mangan ile birlikte görev yapar. Ayrıca

stomaların açılıp kapanması, ozmotik basıncın ayarlanması, karbonhidrat metabolizması ve su stresine dayanıklılığın artırılması üzerinde rol oynar. Bitkilerde klor konsantrasyonu fazlalığı, depo organlara fotosentez ürünlerinin taşınmasında aksaklıklara yol açabilir. Sodyum ise bitkinin gelişmesi, stomaların hareketi ve don tehlikesine karşı bitkiyi korumada etkili olduğu gibi fotosentez miktarı üzerine de olumlu ve önemli etki yapar (Kacar vd., 2002).

Vicia faba (Bakla) bitkisinin genel özellikleri

Vicia faba, Fabaceae familyasına ait olup, gıda olarak tüketildiği gibi yem bitkisi olarak da tarımı yapılan tek yıllık çiçekli bir bitkidir. Enine kesitinde kare gövdeli olan bakla 50–180 cm yüksekliğine sahip sarımsı gri-yeşil renkli bir bitkidir. Türkiye, Mısır, Fas, İspanya, İtalya, Asya ve Çin' de yaygın olarak üretilmektedir. Dünyada geniş çapta üretilen bu bitkinin çeşitli böceklerle ve özellikle afit istilasına uğradığı bilinmektedir (Duc, 1997). Afit istilasının neden olduğu etkiler olarak *Vicia faba* bitkisinde klorofil miktarları istilaya uğramayan bitki yapraklarıyla kıyaslanmış ve istilanın klorofil miktarını azalttığı bulunmuştur (Golawska vd., 2011).

2.2.2 Afitlerde stres

Afitler değişen çevre koşullarına kısa zamanda uyum sağlayabilecek şekilde farklı adaptasyon mekanizmalarına sahip böceklerdir. Kalabalık, konak bitki kalitesi, sıcaklık gibi bazı etmenler afitlerde strese sebep olabilir. Konak bitkinin besin kalitesi afitlerin büyüklüğü, dağılımı, hayatta kalma ve üreme oranının belirlenmesinde oldukça önemli bir faktördür. Bitkinin yaşlanması gibi bazı faktörler bitki besin içeriğini düşürebilir. Konak bitki kalitesindeki bu değişiklikler afitlerde kanatlı birey oluşumunu tetikler. Ayrıca üzerinde yaşadıkları konak bitkide kısa zaman içerisinde birey sayısını çok hızlı bir şekilde artırabilirler. Birey sayısındaki artış afitlerin konak bitkiden yeterince faydalanamamasına yol açar. Örneğin *A. pisum*, bitkideki olgun yapraklardan beslenme sürecinde kalabalığa karşı bir tepki gösterirken, *Dysaphis devectora* konak bitki kalitesinde meydana gelen değişimlere cevap olarak sadece kanatlı birey sayısını artırmaktadır (Dixon,1998). Antibiyotik uygulamalarıyla *Buchnera* varlığının afit morfolojisi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan birinde, 3 farklı afit türünün (*Aphis fabae*, *Megaura viciae*, *Acyrtosiphon pisum*) kanat gelişiminde *Buchnera*'nın

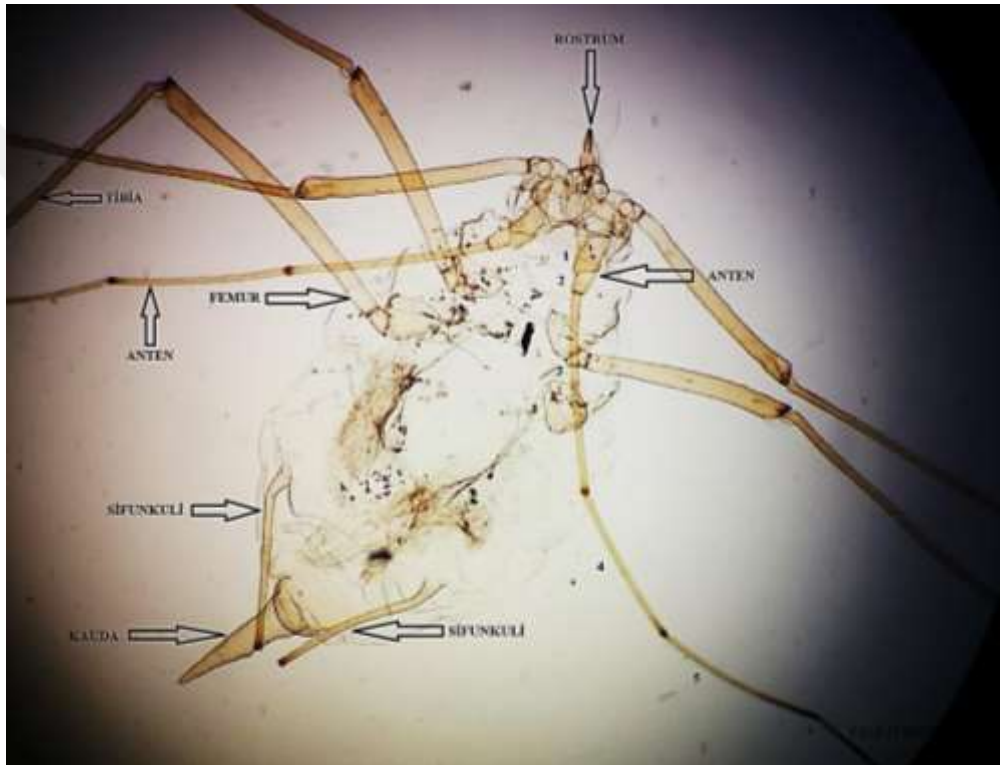
olası etkisi çalışılmıştır. Klortetrasiklin uygulanan fasulye bitkisi üzerinde geliştirilen afitlerin büyüme ve gelişmelerinde sınırlamaların olduğu, doğurganlıklarının düştüğü ya da hiç olmadığı gözlemlenmiştir. Antibiyotik uygulaması, *A. pisum* ve *M. viciae*' nin boyutlarında ve doğurganlıklarında benzer etkiler gösterirken, antibiyotik uygulamasının bu türlerde kanat gelişimini etkilemediği görülmüştür (Hardie ve Leckstein, 2007). Bir başka çalışmada ise *Sitobion avenae* afit türünün kanat dimorfizmine, açlığın ve simbiyont *Buchnera*' nın etkisi çalışılmıştır. Rifampisin antibiyotik uygulaması ile aposimbiyont hale getirilen afitlerin doğurganlığının, vücut ağırlığının, kanatlı birey sayısının düştüğü ayrıca açlığın da kanatlı birey yüzdesini ve hayatta kalma oranını düşürdüğü belirlenmiştir (Zhang vd., 2015). Montllor vd. (2002), sıcaklık stresi altında bezelye afiti *Acyrtosiphon pisum* ve fakültatif bakteriler arasındaki ilişkiyi tanımlamaya çalışmışlar ve fakültatif bakterilerin konağına fayda sağladığını bildirmişlerdir. Çalışmada ikincil simbiyont PASS ve Riccketsia (Pea Aphid Rickettsia) kullanılmıştır. Daha serin hava koşulları ile karşılaştırıldığında afitlerdeki PASS sayısının sıcak havalarda arttığı belirtilmiştir. PASS içermeyen afitler sıcaklık stresi altında üreyemezken, PASS içeren afitlerin % 80-100' ünün yavru birey verdikleri belirtilmiştir.

Morgan vd. (2001), yaptıkları çalışmada iki ayrı kültürde yetiştirilen *Acyrtosiphon pisum*' un farklı sıcaklık derecelerinde (12, 16, 19, 23, 26°C) bazı yaşamsal parametreleri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Afetlerin hayatta kalma oranları, yavruların gelişmesi veya ölmesi, gelişme zamanı, yaşa bağlı doğurganlık oranı değerlendirilmiştir. Yavru gelişmesi ve doğurganlık parametreleri farklı sıcaklıklarda iki kültür arasında değişkenlik göstermiştir. Konağının bitki öz suyundan yeterince sağlayamadığı bazı zorunlu aminoasitleri ve vitaminleri sentezleyip konağının üremesine katkı sağlarken, afitlerin de endosimbiyont bakteri için güvenli bir ortam ve besin sağladığı düşünülmektedir (Güz vd., 2015).

2.3 Afetlerde Morfoloji ve Morfometrik Çalışmalar

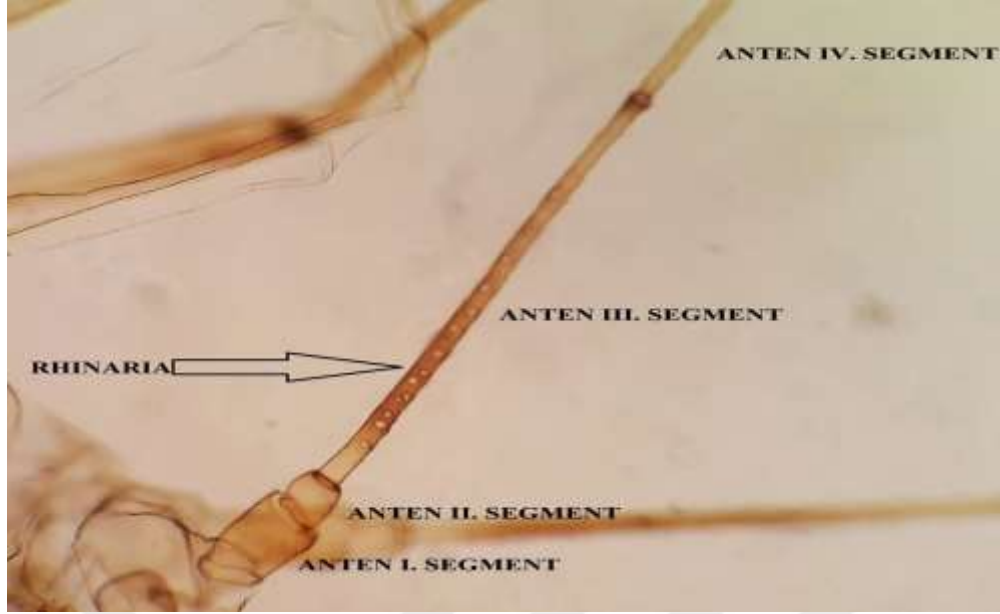
Canlıların tanımlanmalarında kullanılan morfolojik özellikler son yıllarda özellikle böceklerde çevresel koşulların etkilerinin araştırılmasında da kullanılmaktadır. Özellikle küresel ısınmanın etkilerinin afitler üzerinde ne tip farklılıklar oluşturabildiğine ilişkin çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Awmack vd., 1997; Mdellel ve Kamel, 2015).

Afitlerde yapılan morfometrik çalışmalarda en çok kullanılan morfometrik karakterler vücut uzunluğu, anten uzunluğu, antenin birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci segmentinin uzunlukları, antenin altıncı segmentinin bazal kısmı ve terminal kısmı, kauda ve sifunkuli uzunluğu, tibia ve femur uzunluğudur (Mdellel vd., 2019). Afitin genel morfolojik özelliklerine bakıldığında; 1-7.8 mm arasında değişen boyutlara sahip olan afitlerin vücutu 18 segmentten oluşur (Şekil 2.2.). Bu segmentlerin altı tanesi baş, üç tanesi gövde (thoraks) ve dokuz tanesi de karın kısmını oluşturur (Blackman ve Eastop, 2006).



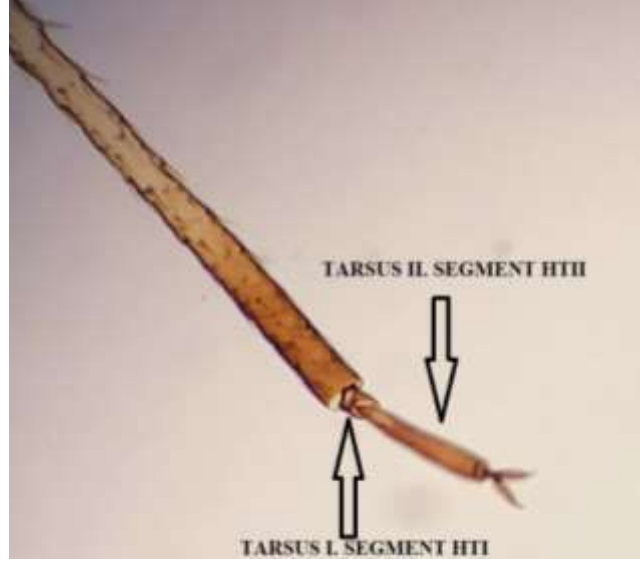
Şekil 2.2. Kanatsız *A. pisum* afit türünün morfolojik kısımları

Baş üzerinde anten ve ağız parçaları yer almaktadır. Afitlerde baş genellikle vücuda göre küçük boyutlardadır. Genellikle gövde ve baş ayrıdır ancak bazı türlerde birleşik de olabilir. Gözler, rostrum, bir çift anten baş üzerinde bulunan yapılardır. Afitlerde anten farklı şekillerde olmaktadır. Anten yapısı üç ile altı segment arasında değişmektedir. Segmentler üzerinde birincil ve ikincil rhinaria adı verilen duyu organları bulunur (Şekil 2.3.). Özellikle kanatlı bireylerin sınıflandırılmasında bu duyu organlarının büyüklüğü, sayısı ve konumu oldukça önemlidir. Anten üzerinde tüyler de bulunabilir ve bu tüylerin uzunluğu, şekli de tür tanımlamada kullanılan bir karakterdir.



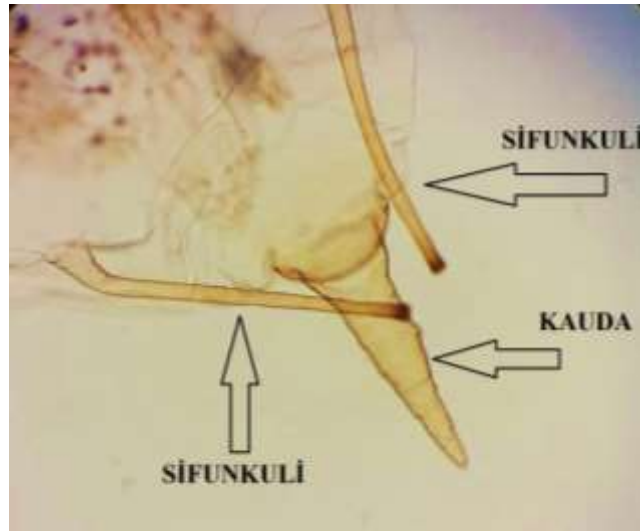
Şekil 2.3. *A. pisum*'un anten segmentleri (1-4 segment)

Son anten segmenti (VI. segment), geniş bir kaide kısmı (Base) ile dar bir uç kısmından (PT) oluşur. Bu segmentin uç kısmının taban kısmına olan oranı (PT/Base) sınıflandırmada çok fazla kullanılan karakterlerdendir (Blackman ve Eastop, 2006). Ayrıca afitler, bitki özsuyunu emmek için rostrum (hortum) adı verilen ağız parçası bulundurlar. Rostrumun uzunluğu ve şekli afit türüne göre farklılık göstermekle beraber, beslendiği konak bitkiye göre de farklılık gösterebilir. Rostrum genellikle beş segmentli bir yapıdır. Afrit tür teşhisinde rostrum IV+V segmentlerin uzunluğu ve son segmentteki birincil ve ikincil tüylerin sayısı da yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.4.). Çoğu afrit türünde iyi gelişmiş bileşik gözler bulunurken bazı türlerde üç fasetli (triommatidium) gözler bulunmaktadır (Blackman ve Eastop, 2006).



Şekil 2.5. *A. pisum*'un arka bacak tarsus segmentlerinin görünümü

Abdomen (karın), sekiz segmentten oluşur. Dokuzuncu segment kuyruk ve anal plak adı verilen yapılara dönüşmüştür. Kanatsız bireylerin karın kısımları, kanatlı bireylere göre daha küçüktür. Abdomenin beşinci segmentinin dorsal kısmında türe özgü şekil ve boyutlarda olan sifunkuli adı verilen bir çift yapı bulunur (Şekil 2.6.). Sifunkuli uzunluğu türler arasında değişebildiği gibi farklı konak bitki üzerinde gelişen aynı türlerde de değişebilmektedir. Sifunkuliler tehlike anında alarm feromonları salgırlar bu nedenle muhtemelen daha uzun sifunkuliye sahip afitler alarm feromonunu daha geniş bir alana salarak tehlike diğer bireylere bildirilir. Bu sayede afitler çevresel koşullara adapte olabilirler (Mehrpavar vd., 2012).



Şekil 2.6. *A. pisum*'da sifunkuli ve kaudanın genel görünümü

Abdomenin en son segmentinde anüsün hemen üzerinde kauda adı verilen kuyruk yapısı yer alır (Şekil 2.6.). Afit türlerine göre farklı büyüklük ve şekillerde olabilen kauda genel olarak boğumlu, üçgen, dil, miğfer bazen de yuvarlak şekillerdedir. Kuyruğun şekli ve üzerinde bulunan tüy sayısı, sifunkuliye olan oranı sınıflandırmada önemlidir. Bir afit kolonisinde bireylerin ergin olup olmadığı belirgin bir kauda yapısının varlığı ile anlaşılır. Yaprak bitleri çok farklı renklerde olabilirler. Vücut renkleri pembe, yeşil, siyah, beyaz, bronz, koyu kahve veya üzerlerindeki az veya yoğun mumsu tozdan dolayı açık turuncu, grimsi mavi tonlardadır (Blackman ve Eastop, 2006).

***Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776)**

Yaygın olarak bezelye yaprak biti olarak bilinen *Acyrtosiphon pisum*, Aphididae familyasında bitki özsuğu ile beslenen bir afit türüdür. Dünya üzerinde bezelye, bakla, yonca gibi yem bitkilerinin de içinde bulunduğu birçok baklagil türü ile beslenirler. Ayrıca yaklaşık 30 kadar virüsün taşınmasında vektör görevi üstlenen, ciddi ürün kayıplarına sebep olan büyük tarımsal öneme sahip afit türleri arasında değerlendirilmektedir (Khan ve Yoldaş, 2018).

Sınıf	:	Böcekler
Takım	:	Homoptera
Alt Takım	:	Sternorrhyncha
Üst Familya	:	Aphidoidea
Familya	:	Aphididae
Cins	:	<i>Acyrtosiphon</i> Mordvilko, 1914
Tür	:	<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harris, 1776



Şekil 2.7. Kanatlı (a) ve kanatsız (b) *Acyrtosiphon pisum* türünün genel görünümü

Kozmopolit bir tür olan *A. pisum*, konak olarak otsu bitkileri ve ağaçları tercih edebilen önemli bir tarım zararlısıdır. Günümüzde biyolojik çalışmalarda yoğun bir şekilde tercih edilen model bir organizmadır (Brisson ve Stern, 2006). Laboratuvar koşullarında konak bitki üzerinde üreme döngüsünü kolayca tamamlayabilir ve birçok afit türüne göre büyük boyutlu olması da fizyolojik çalışmaları kolaylaştırmaktadır. 2010 yılında Uluslararası Yaprak biti Genomik Konsorsiyumu, $2n = 8$ kromozomda yaklaşık 525 megabaz ve 34000 öngörülen genden oluşan bezelye yaprak biti genomunun açıklamalı bir taslak dizisini yayınlamıştır. Bu yayın, *A. pisum*' un ilk genomunu oluşturmuştur. Genom büyüklüğü ile ilgili yapılmış bir çalışmada son yapılan düzeltmeye göre *A. pisum* genom büyüklüğünün 464 Megabaz olduğu ve yaklaşık 2000 gen ailesi içerdiği belirlenmiştir (Anonymous 2018). Kanatsız ergin bireyler genellikle pembe ya da yeşil renkli olarak belirlenmiştir (Şekil 2.7.).

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Örneklerin Toplanması

Niğde ilinde gerçekleştirilen arazi çalışmalarında *Acyrtosiphon pisum* olduğu tahmin edilen afit örnekleri *Vicia faba* bitkisi üzerinden ince bir fırça yardımıyla % 95' lik etil alkol bulunan ependorf tüpler içerisine alınmıştır (Şekil 3.1.). Toplanan örnekler teşhisi yapılmak üzere etiketlenmiştir.



Şekil 3.1. *A. pisum* bireylerinin örnekleme (Niğde, Çiftlik, Murtaza köyü)

3.2 Örneklerin Preparasyonu ve Teşhisi

Arazi çalışmaları sonucu *Vicia faba* bitkisi üzerinden toplanan örneklerin *A. pisum* olduğunun belirlenebilmesi için preparasyonu ve teşhisi yapılmıştır.

3.2.1 Preparasyon

Preparasyon işlemleri Martin (1983)' de belirtilen prensipler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- % 95' lik etanolde bulunan örnekler 1-2 dakika 80°C sıcak su banyosunda kaynatılmıştır.
- Ardından sonra tüplerdeki alkol pipet yardımıyla uzaklaştırılıp örnekler % 10' luk KOH çözeltisi içerisinde 3-5 dakika daha kaynatılmıştır.
- KOH tüplerden boşaltılıp ve distile su ile 5 dakika kadar yıkandı ve yıkama işlemi birkaç kez tekrarlanmıştır.
- Daha sonra örneklerin içerisinde yüzebileceği kadar karanfil yağı eklenip yaklaşık 20 dakika kadar renk açılana kadar beklenmiştir.
- Rengi açılan örnekler, kanada balsamı sürülen lam üzerine yerleştirilmiştir.
- Lamel ise ksilene batırılıp çıkartıldıktan sonra uygun açıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılmıştır.
- Preparasyon işlemi biten preparatlar etiketlenip numaralandırılmıştır.
- Preparatlar etüvde 50°C' de bir hafta kurumaya bırakılmıştır.

Tamamen kuruyan preparatlar, örneklerin teşhisi yapılmak üzere mikroskop altına alınmıştır.

3.2.2 Örneklerin teşhisi

Afitlerin teşhisi için konak bitkiye göre hazırlanan tayin anahtarı kullanılmıştır (Blackman ve Eastop, 2018). Teşhisi yapıлып *A. pisum* olduğu belirlenen örnekler stok kültür oluşturmak amacıyla *V. faba* bitkileri üzerine alınmış ve yaklaşık 2 hafta boyunca çoğalmaları sağlanmıştır.

3.3 Deneme Setinin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan bakla bitkisinin (*Vicia faba*) tohumları özel bir firmadan (SIMAGRO.AGRO&SEED COMPANY) satın alınmıştır. Tohumlar yaklaşık 5 kg toprak alabilen 15 cm yüksekliğinde dikdörtgen şeklindeki plastik saksılara rastgele ekilmiş ve düzenli aralıklarla sulama yapılarak düzenli havalandırılan 25 ± 2 °C oda sıcaklığında çimlenme süreci beklenmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. *Vicia faba* fidelerinin genel görünümü

Ekimden yaklaşık 15 gün sonra bitkilerin çıkışı izlenmiştir (Şekil 3.2.). Kontrol grubu ile birlikte antibiyotik ve çeşitli azot kaynaklarının kullanıldığı (0,03M) solüsyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.1.). Bitkiler ihtiyacı olan azotu topraktan nitrat ya da amonyum formunda almaktadır bu yüzden çalışmada azot kaynağı olarak amonyum nitrat, amonyum klorür ve sodyum klorür belirli oranlarda kullanılmıştır (Harrison vd., 2007). Ayrıca aposimbiyont bireylerin eldesi için klortetrasiklin (ACROS ORGANICS, CHINA) antibiyotiği literatürde etkili olduğu konsantrasyonlarda hazırlanarak (50µg/ml) tatbik edilmiştir (Wilkinson ve Douglas, 1995a). Antibiyotiğin stok solüsyonları -20 °C' de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik kullanılarak hazırlanan solüsyonlar ve içerikleri

Grup	Grup Kodu	Solüsyon içeriği
1.	SN	NaNO ₃
2.	SNC	NaNO ₃ + Klorotetrasiklin
3.	AN	NH ₄ NO ₃
4.	ANC	NH ₄ NO ₃ + Klorotetrasiklin
5.	AC	NH ₄ Cl
6.	ACC	NH ₄ Cl + Klorotetrasiklin
7.	C	Klorotetrasiklin
8.	K	Kontrol

Çalışmada kullanılan yaklaşık 15 günlük bakla bitkileri topraktan alınarak içerisinde perlit bulunan saksılara üç tekerrürlü olmak üzere aktarılmıştır. Perlite aktarma sırasında bitkinin köklerinde nodüller kalmayacak şekilde 3-5 cm kadar traşlanmıştır (Hardie ve Leckstein, 2007). Uygulamanın yapılacağı bitkiler üzerine ortalama 30 birey olmak üzere 3-5 günlük afidler yerleştirilmiş ve afidelerin bitkiden uzaklaşmaması için kafeslenmiştir. Bitkilere 16:8 fotoperiyot ve 23 ± 2 °C sıcaklıkta sekiz gün boyunca eşit miktarlarda (50ml/gün) hazırlanan solüsyonlar uygulanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Deney düzeneğinin tek başına (a) ve genel (b) görünümü

Uygulama bitiminde konak bitki üzerinden *A. pisum* afit bireyleri ince bir fırça yardımıyla toplanmıştır. Toplanan afit örneklerinin bir kısmı morfolometrik çalışmalarda bir kısmı da moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza altına alınmıştır. Ayrıca afitlerin konakladığı bitki örnekleri de gruplandırılıp tartımları yapıldıktan sonra analizler için alüminyum folyo içerisinde -20 °C’ de dondurucuda saklanmıştır.

3.4 Moleküler Çalışmalar

Farklı azot kaynakları ile antibiyotik içeren solüsyonların uygulandığı bitkiler üzerinden toplanan afit bireyleri ince bir fırça yardımıyla steril ependorf tüplerine 2 paralel (ayrı ayrı 1’ er ve 2’ şer birey) olacak şekilde alınarak DNA izolasyonuna hazır hale getirilmiştir. Laboratuvar çalışmaları boyunca DNA’ nın bozulmasına neden olabilecek bütün etkenlere karşı tüm kimyasallar buz içinde muhafaza edilmiştir. Kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için kullanılan bütün malzemeler otoklavlanarak tamamen steril hale getirilmiştir.

3.4.1 Genomik DNA izolasyonu

Buchnera aphidicola endosimbiyont bakterisinin varlığını belirleyebilmek için muhafaza edilen afit örnekleri DNA izolasyonu için hazırlanmıştır. DNA izolasyonu için DNA ekstraksiyon kiti QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit (50) kullanılmıştır.

QIAGEN DNeasy Blood&Tissue Kit Prosedürü

1. Çalışılacak materyal 1.5 ml santrifüj tüpüne yerleştirilip, üzerine 180 µl Buffer ATL ve 20 µl proteinaz K eklenir ve vortekslemek suretiyle iyice karıştırılıp 56oC de inkübe edilir. İnkübasyon süresince ara sıra vortekslenir.
2. 200 µl Buffer AL eklenip vorteksleyerek iyice karışması sağlanır.
3. 200 µl etanol (%96-100) eklenip iyice karıştırılır.
4. DNeasy Mini spin column, 2 ml koleksiyon tüplerine yerleştirilir ve karışım bu tüpe pipetlenir. Bir dakika boyunca $\geq 6000 \times g$ ’ de (8000 rpm) santrifüjlenir. Süzüntü koleksiyon tüpü ile beraber çıkarıp atılır.

5. İki ml yeni koleksiyon tüpüne spin column yerleştirilir. 500 µl Buffer AW1 eklenir. Bir dakika süreyle $\geq 6000 \times g$ ' de santrifüjlenir. Süzüntü koleksiyon tüpü ile beraber çıkarıp atılır.
6. İki ml yeni koleksiyon tüpüne spin column yerleştirilip 500 µl Buffer AW2 eklenir ve $20000 \times g$ ' de (14000 rpm) 3 dakika santrifüjlenir. Süzüntü koleksiyon tüpü ile beraber çıkarıp atılır.
7. Spin column yeni bir 1.5/2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
8. Spin column merkezine gelecek şekilde 200 µl Buffer AE eklenerek DNA elusyonu sağlanır. Oda sıcaklığında (15-20°C) bir dakika inkübe edilir. Ardından $\geq 6000 \times g$ ' de bir dakika santrifüjlenir.
9. İsteğe bağlı olarak, DNA verimini artırmak için 8. Adım tekrarlanabilir.

3.4.2 Primerler

Çalışmada *Buchnera aphidicola* için spesifik olduğu bilinen Buch16S1R ve Buch16S1F (Ella Biotech GmbH, SENTEGEN) primer çiftleri kullanılmıştır (Koga vd., 2003; Tsuchida vd., 2002). Primerlerin nükleotid dizileri, erime sıcaklıkları ve GC içerikleri Çizelge 3.2. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PZR çalışmasında kullanılan primerler ve erime sıcaklıkları

Primer	Baz Dizisi (5'-3')	%GC Oranı	Erime Sıcaklığı (Tm)	Kaynak
Buch16S1R	CTTCTGCGGGTAACGTCA CGAA	%54,5	62,1	Tsuchida vd., 2002
Buch16S1F	GAGCTTGCTCTCTTTGTCGGCAA	%52,2	62,4	Tsuchida vd., 2002

3.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu bileşenlerinin miktarı ve reaksiyon koşulları ön denemelerle optimize edilmiştir. PZR karışımı toplamda 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Çizelge 3.3.'de PZR karışımında kullanılan kimyasalların alınan hacimleri ve konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları

PZR Reaksiyon Bileşenleri	Alınan hacim (µl)	Son Konsantrasyon
1 5U/µl Taq DNA Polimeraz (invitrogen)	0.2 µl	1.5 u
2 10mM dNTPmix (vivantis)	1 µl	0.2 mM
3 10X PZR Buffer (invitrogen)	5 µl	1X
4 50mM MgCl ₂ (invitrogen)	1.5 µl	1.5 mM
5 BSA (10mg/ml, SIGMA ALDRICH)	1 µl	---
6 10µM Buch16S1R (Ella Biotech GmbH)	2.5 µl	0.8 µM
7 10 µM Buch16S1F (Ella Biotech GmbH)	2.5 µl	0.8 µM
8 dH ₂ O	34.8 µl	---
9 Total DNA	1.5 µl	---
TOPLAM	50 µl	

İzole edilen DNA örnekleri ile reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra 16S rDNA gen bölgesi Çizelge 3.4.’ de verilen PZR koşullarında “Gradient Thermocyclers” (Applied Biosystems) kullanılarak çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.4. PZR döngü sayısı ve sıcaklıkları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
Ön denaturasyon	94	180	1
Denaturasyon	94	45	
Primer Bağlama	57	30	35
Zincir uzama	72	45	
Sonlandırma	72	600	1
Saklama	8	∞	

3.4.4 Agaroz jelin hazırlanması

PZR ürünleri için % 1’lik agaroz jel hazırlanır. Steril bir erlen içerisine 1 g agaroz (SIGMA ALDRICH) ve üzerine 100 ml 1X TAE (Trisma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA) çözeltisi eklenip erlenin ağzı alüminyum folyo ile kaplanarak karıştırılır. Elde edilen karışım mikrodalga fırında tamamen çözünene kadar ısıtılır. Daha sonra karışımın üzerine 8 µl 10mg/ml’ lik EtBr (Ethidium Bromide) çözeltisinden eklenip hafifçe çalkalanır. Manyetik karıştırıcıda karışımın sıcaklığı 50-55°C’ ye gelinceye kadar karıştırılır. Elde edilen karışım hazırlanan elektroforez tepsisine yavaşça dökülür ve taraklar yerleştirilir. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilmelidir.

Agaroz jel tamamen katılaşıncaya kadar beklenir ve ardından taraklar dikkatli bir şekilde jelden alınır. Elektroforez tepsisi elektroforez tankına yerleştirilir ve üzerine jeli tamamen örtecek kadar 1X TAE çözeltisi eklenir.

3.4.5 PZR ürünlerinin agaroz jel üzerinde yürütülmesi ve görüntülenmesi

PZR ürünleri, elde edilip edilmediği ve kalitesini belirlemek amacıyla agaroz jelde yürütülmüştür. Temiz PZR tüplerine elde edilen PZR ürünlerinden 10 µl alınmıştır. Üzerine 2 µl yükleme boyası (Thermo Scientific 6X Loading Dye) eklenip pipetle karıştırılmıştır. Karışımdan 10 µl alınarak jelde açılan kuyucuklara pipetlenmiştir. Ayrıca 100 bp DNA marker (Vivantis VC 100bp Plus DNA Ladder) kullanılmış ve jelde açılan kuyucuklara pipetlenmiştir. Örneklerin jel üzerinde 80 volt doğrusal akım verilerek, elektriksel alanda 45 dakika yürümesi sağlanmıştır. Daha sonra jel, elektroforez tankından çıkartılıp görüntüleme cihazına (Vilber Lourmat Quantum-ST4 1100/20M) yerleştirilmiş ve UV ışını altında görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir. Jel üzerinde görüntülenen her bir örneğe ait bantlar kontrol edildikten sonra PZR ürünleri, dizi analizi için Sentebiolab Biotech (ANKARA) firmasına gönderilmiştir.

3.5 Morfometrik Analizler ve Kullanılan Karakterler

Konak bitki kalitesinin ve azot içeriğinin, afitlerin morfolojisi, demografisi, hayatta kalma, doğurganlık ve ömürlerini etkileyen önemli faktörler olduğu bilinmektedir (Dixon, 1987; Dixon vd.,1993). Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulaması yapılan bitkilerden toplanan *A. pisum* afit bireylerinin, morfolojik karakterleri arasında ortaya çıkabilecek olası farklılıkları belirlemek amacıyla teşhisi yapılan bireylerin morfometrik karakterlerinin ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Morfometrik karakter ölçümleri, Olympus BX-51 mikroskopunun 4X ve 10X objektifi kullanılarak yapılmıştır. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulaması yapılan bitkilerden örneklenen afitlerden 177 birey üzerinden morfometrik ölçümler yapılmıştır. Toplanan örneklerin bir kısmı ergin olmadığından ya da kanatlı olduğundan dolayı ölçümleri yapılmamıştır. Farklı besin içerikli solüsyonların uygulandığı bitkiler üzerinden örneklenen popülasyonlar arasında büyüklük ve şekil açısından bir farklılık olup olmadığını belirleyebilmek için, afit morfometrisiyle ilgili yapılmış çalışmalarda kullanılan bazı karakterler belirlenmiştir (Footit ve Mackauer, 1990).

- **BL** (vücut uzunluğu)
- **Ca. L** (Kauda Uzunluğu)
- **URS L** (Rostrum IV. ve V. segmentlerinin uzunluğunun ölçümü)

Belirlenen bu karakterlerin çoğunluğu afit sistematğinde kullanılan karakterler olmakla birlikte diğer ayırt edici morfolojik özellikler de ölçüme dahil edilmiştir. Afitle son zamanlarda yapılan çalışmalarda afitlerin çevresel koşullarda meydana gelen değişimlere hızlı cevap vermeleri nedeniyle bilateral karakterlerinde meydana gelebilecek farklılıklar (aynı karakterin sağ-sol uzunlukları arasındaki farklılık) nedeniyle adeta bir biyoindikatör olarak değerlendirildikleri bilinmektedir (Görür, 2006). Yapılan çalışmada değişik kimyasal içerikli solüsyonların gerek bitkinin besin kalitesini etkileyebilme gerekse afitlerin endosimbiontlarını baskılayabilme ihtimali nedeniyle farklı kültürlerden örneklenen popülasyonların bilateral karakterlerinde görülen farklılıklar da dikkate alınmıştır. Bilateral karakterlerde olası farklılıkları tespit etmek için karakterler seçilirken bilateral olarak bulunan anten, sifunkuli ve 3. Bacak segmentlerinin sağ ve sol uzunluklarının ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bunlar;

- **R.A3L** (Sağ Antenin III. seg. uzunluğu)
- **R. A6Pt** (Sağ Antenin 6. segmentinin uç kısmının ölçümü)
- **R.A6Base** (Sağ Antenin 6. segmentinin taban uzunluğunun ölçümü)
- **R.A6Pt/A6Base** (Sağ Antenin 6. segmentin uç kısmının ölçümünün taban uzunluğunun ölçümüne oranı)
- **R.AL** (Sağ Anten uzunluğu)
- **R.HT. 3L** (Sağ Hind Tibia uzunluğu)
- **R.HT I** (Sağ Hind Tarsus I. Segment uzunluğu)
- **R.SIPH L** (Sağ Sifunkuli uzunluğu),
- **L.A3L** (Sol Antenin III. seg. uzunluğu),
- **L. A6Pt** (Sol Antenin 6. segmentinin uç kısmının ölçümü),
- **L.A6Base** (Sol Antenin 6. segmentinin taban uzunluğunun ölçümü),
- **L.A6Pt/A6Base** (Sol Anten 6. segmentin uç kısmının ölçümünün taban uzunluğunun ölçümüne oranı),
- **L.AL** (Sol Anten uzunluğu),
- **L.HT. 3L** (Sol Hind Tibia Uzunluğu),

- **L.HT I** (Sol Hind Tarsus I. segmet uzunluğu),
- **L.SIPH L** (Sol Sifunkuli uzunluğu),

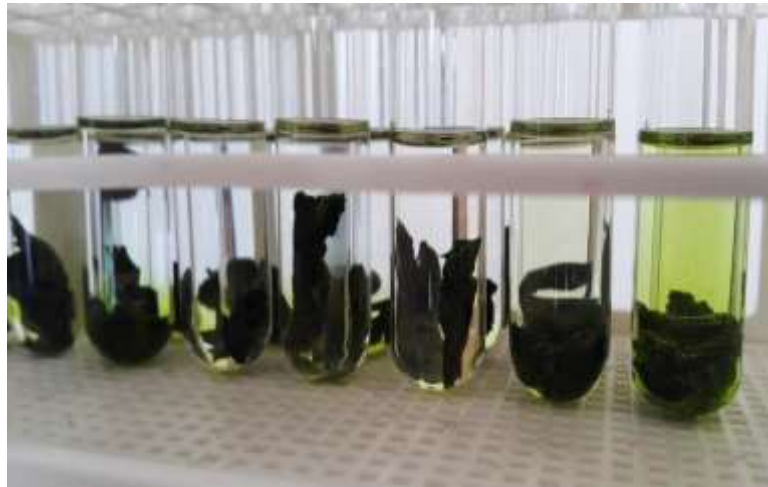
Her bir örnek üzerinden yapılan ölçümlerde, toplam 19 farklı morfolojik karakter ele alınmıştır. Mikroskopik ölçümler sonucunda elde edilen sayısal veriler Microsoft Excel programı içerisine kaydedilmiş ve daha sonra istatistiksel analizler için SPSS (SPSS 22 for Windows paket programı) programına aktarılarak analizleri yapılmıştır (Landau ve Everitt, 2004).

3.6 *Vicia faba* Bitkisi ile Yapılan Analizler

Çalışma materyalini oluşturan *A. pisum* afit örneklerinin konak bitkiye uygulanan solüsyonlardan etkilenebileceği, bitki üzerinde olduğu sürece bitkide strese sebep olabileceği ayrıca bitkinin topraktan aldığı azot kaynağının bitki kompozisyonunda değişiklikler yaratabileceği ihtimali üzerinde durularak bitkide bazı analizler de gerçekleştirilmiştir (Koç ve Üstün, 2008).

3.6.1 Fotosentetik pigment miktarının belirlenmesi

Farklı besin içerikli solüsyonların uygulandığı *Vicia faba* bitkisinin yapraklarında fotosentetik pigment miktarlarının tayin edilebilmesi için Witham vd., (1971) tarafından verilen yöntem uygulanmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. *Vicia faba* bitkilerinin fotosentetik pigment miktarı ölçümüne hazırlanması

Bitki yaprak dokusunun bir gramındaki klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarının hesaplanması için spektrofotometrede (BOECO S-20 Spectrophotometer) 450 nm, 645 nm ve 663 nm dalga boylarında absorbans değerleri okunmuştur. Alınan ekstraktların ölçümlerden elde edilen değerler aşağıda verilen eşitliklerde yerlerine konulmak suretiyle hesaplamalar yapılmıştır.

$$\text{mg klorofil a/g doku} = [12,7 \times (D663) - 2,69 (D645)] \times (V/ 1000.W)$$

$$\text{mg klorofil b/g doku} = [22,9 \times (D645) - 4,68 (D663)] \times (V/ 1000.W)$$

$$\text{mg toplam klorofil/g doku} = [20,2 \times (D645) + 8,02 (D663)] \times (V/1000.W)$$

mg toplam karotenoid/g doku = 4,07 x D450 - (0,0435 x Kla miktarı + 0,367 x Klb miktarı) Eşitliklerde: D, klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki optik yoğunluğunu (absorbans değerini); V, % 80'lik aseton son hacmini; W, ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığını göstermektedir.

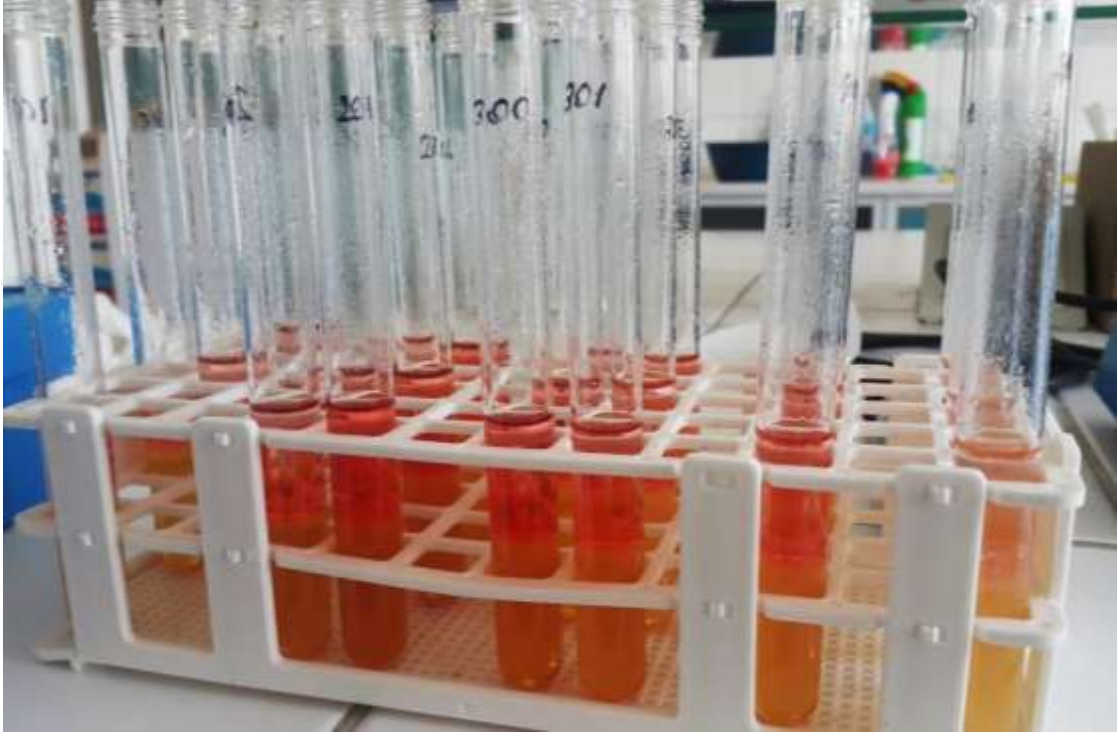
3.6.2 Prolin konsantrasyonunun belirlenmesi

Prolin konsantrasyonunun belirlenmesinde Bates vd., (1973) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, kontrol ve deneme gruplarının her birinden üçer adet bir gram taze yaprak örneği alınarak 10 mL % 3'lük sülfosalisilik asit içerisinde homojenize edilmiş, elde edilen homojenat filtre kağıdı yardımıyla süzölmüştür (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. *Vicia faba* bitkilerinin ekstraksiyonu

24 saat boyunca serin ve karanlık bir ortamda tutulan süzüntüden temiz cam tüplere 2 mL alınmış ve üzerine 2 mL asit ninhidrin ile 2 mL glasiyel asetik asit ilave edilmiştir. Ardından bir saat boyunca 100 ° C' de su banyosunda tutulmuştur. Reaksiyonun durdurulabilmesi için buz banyosu kullanılmıştır. Ardından çözeltiliye 4 mL soğuk toluen ilave edilip vorteks yardımıyla karıştırılmıştır (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Prolin miktarı ölçümü sırasında renk değişimi

Daha sonra sıvı fazdan çekilen toluen içeren fraksiyonun spektrofotometre kullanılarak 520 nm dalga boyunda absorbans değeri okunmuştur. Okunan değerler kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplanmış (kalibrasyon eğrisi için 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 μmol /prolin içeren standartlar hazırlanmış) ve μmol prolin, g^{-1} taze ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.6.3 Toplam protein miktarının belirlenmesi

Kontrol ve deney gruplarında toplam protein miktarının belirlenebilmesi için her bir gruptan 3 tekerrürlü olarak birer gram yaprak örneği alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri, 1 mM EDTA içeren, 5 mL pH 7.8'lik 0.05 M Na-P tamponunda buz banyosunda ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstrakt soğutmalı santrifüj kullanılarak 13000 rpm' de 30 dakika

süre ile santrifüj edilmiştir. Çalışmada kullanılan Bradford (1976) yöntemi fosforik asitli ortamda proteinlerin “Coomassie Brilliant Blue” reaktifi ile kompleks oluşturması ve bu kompleksin 595 nm’ de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem, diğer protein analiz yöntemlerine göre, çok kısa sürede uygulanmaktadır. Ayrıca bozucu faktörlerin pek söz konusu olmaması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalması ve boyanın proteine bağlanmasının çok hızlı gerçekleşmesi (ortalama 2 dakika) gibi üstünlükleri nedeniyle tercih edilmiştir. Yöntemin duyarlılığı da 1-100 µg arasındadır. Santrifüj işlemi sonrası uygun hacimde alınan süpernatantlara, “Coomassie Brilliant Blue” protein boyası içeren bir mL reaksiyon karışımı eklenmiştir. 25 ° C de 10 dakika bekletilen örnekler, spektrofotometre yardımıyla 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Okunan absorbans değerleri, BSA standartları (0,02-0,2 mg/ml) ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine uygulanmıştır. Böylece örneklerdeki çözünebilen toplam protein miktarı, mg.g⁻¹ taze ağırlık olarak belirlenmiştir.

3.6.4 Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi

Fenolik bileşikler bitkilerdeki en önemli ikincil metabolit gruplarından biri olup antioksidan fonksiyona sahiptirler. Yapılan çalışmalarda; farklı çevresel faktörler ve stres koşulları altında feniloproponoid metabolizmasında ve fenolik bileşik miktarlarında artış meydana geldiği gözlenmiştir (Büyük vd., 2012). Toplam fenolik madde miktarının tespiti için farklı azot kaynağı ve antibiyotik kullanılarak oluşturulan 8 farklı solüsyonun verildiği *Vicia faba* bitkilerinin her birinden üç adet 0,1 gram taze yaprak örneği alınarak, 2,5 ml % 80 metanol ile havan kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Fenolik madde miktarı tayini için gallik asit eşleniği olarak da bilinen Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılmıştır (Singleton vd., 1999).

- Homojenize edilen örnekler 80 ° C’ de 15 dakika su banyosunda inkübasyona tabi tutulur.
- Homojenat tüplere aktarılarak 500 rpm’ de 10 dakika santrifüjlenir.
- Süpernatant başka bir tüpe aktarılır ve altta kalan faza metanol eklenip tekrar santrifüjlenir.
- Süpernatant bir önceki tüpe eklenir.
- Toplam süpernatanttan 0,1 ml alınır ve üzerine bir ml folin eklenip 5 dakika

beklenir.

- Üzerine bir ml % 7,5' lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) eklenip, 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Kör tüpe karşı ile 765 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansı ölçülür.
- Sonuçlar gallik asit standartlarına göre hesaplanır.

Toplam fenolik madde içeriği ise µg GAE/mL olarak ifade edilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965, Gayosa vd., 2004).

3.6.5 Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Bitkiler oksidatif stres koşulları altında yaşamlarını sürdürebilmek ve karşılaştıkları stresle başa çıkabilmek için ROS' un (Reaktif oksijen türleri) kontrolü ve detoksifiye edilmesini sağlayan çeşitli antioksidanlar bulundurlar (Büyük vd., 2012).

Bu antioksidanlardan olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinin belirlenebilmesi için *V. faba* bitkilerinin kontrol ve deney gruplarından üçer kez birer gram yaprak örneği tartılarak alınmıştır. Bir gram yaprak örneği SOD enzim aktivitesi tayini için 1 mM EDTA içeren, 5 ml pH 7,8'lik 0,05 M Na-fosfat tamponunda; CAT aktivitesi tayini için 1 mM EDTA içeren, 3 ml pH 7,6'lik 0,05 M Na-fosfat tamponunda buz banyosunda ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon eldesi soğutmalı santrifüjde 13000 rpm' de 30 dakika süre ile santrifüj edilerek sağlanmıştır.

3.6.5.1 Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Katalitik aktivitesi çok yüksek olan süperoksit dismutaz (SOD) aerobik canlılarda süperoksit radikalinin (O₂⁻) H₂O₂'e (Hidrojen peroksit) çevrilmesi sırasında görevli bir enzimdir. Yapılan çalışmalarda; SOD ifadesindeki artışın biyotik ya da abiyotik strese bağlı oluşan oksidatif stresle başa çıkmada ve bitkilerin stres koşulları altında canlılığını devam ettirmesine katkı sağlamada önemli rolleri olduğu ileri sürülmüştür (Büyük vd., 2012).

Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından uygulanan yöntemle göre SOD enziminin aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Yöntem, 560 nm dalga boyunda örnekte bulunan SOD enzimi tarafından, nitroblue tetrazolium'un (NBT) fotokimyasal indirgenmesinin inhibe edilmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı, 50 mM Na-P tamponu (pH 7,8), 33 µM NBT, 10 mM L-Methionine, 0,66 mM EDTA ve 0,0033 mM Riboflavin içermektedir. Süpernatant uygun miktarda seyreltilerek üzerine 3 mL reaksiyon karışımı eklenmiştir. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için karışım, 10 dakika $300 \mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti altında, oda sıcaklığında tutulmuştur. Bu sürenin sonunda 560 nm' de örneklerin absorbans değerleri spektrofotometre ile okunmuştur. Enzim aktivitesi, NBT' nin % 50 inhibisyonu için gerekli SOD miktarı, bir enzim ünitesi olarak hesaplanmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹.g⁻¹ taze ağırlık olarak belirlenmiştir.

3.6.5.2 Katalaz (CAT) enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkabilmek için çeşitli antioksidanlara sahiptirler. Enzimatik bir antioksidan olan katalaz enzimi bitki hücrelerinde peroksizomlarda yerleşmiştir. CAT; stres koşulları altında oluşan H₂O₂' in H₂O ve O₂' e dönüşümünü sağlayarak hücreleri strese karşı korumada görevli en önemli enzimatik antioksidanlardandır (Büyük vd., 2012).

V. faba bitkilerine uygulanan farklı çözeltilerin ve afitlerin bitkide strese neden olabileceği düşüncesiyle bitkilerde CAT enzim aktivitesi tayini gerçekleştirilmiştir. CAT enziminin aktivitesinin belirlenebilmesi için, Bergmeyer (1970) yöntemi uygulanmıştır. Yukarıda verilen (Bölüm 3.6.5) prosedür uygulanarak elde edilen süpernatantlara, 0,05 M Na-P tamponu (pH 7,0), % 3 H₂O₂ ve 1 mM EDTA ilave edilmiştir. Daha sonra H₂O₂' in tüketilmesine bağlı absorpsiyon değişimi spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific type) 240 nm dalga boyunda bir dakika süreyle izlenmiştir. Dakikada tüketilen µmol H₂O₂ miktarı, bir enzim ünitesi olarak saptanmıştır. 240 nm' de spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹. g taze ağırlık⁻¹ olarak belirtilmiştir.

3.7 İstatistik Değerlendirme

Yapılan bütün ölçümler ve elde edilen analiz verileri SPSS programında Varyans analizine (Multiple Range Testlerinden Tukey testi, $p<0.05$) göre değerlendirilmiştir (Tukey, 1954). Ortalamaların standart hata ve sapma değerleri de aynı programda hesaplanmıştır.



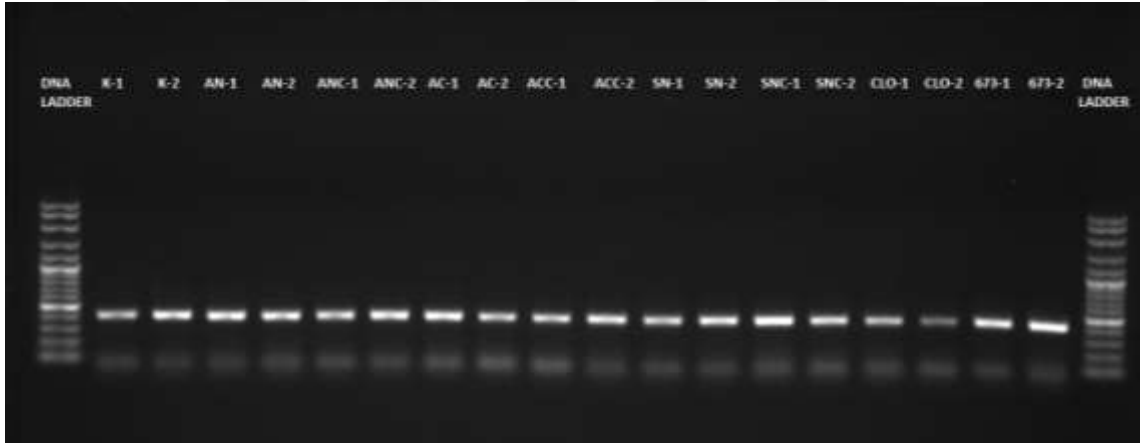
BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında elde edilen verilerin analizleri sonucunda ortaya çıkan sonuçlar, moleküler bulgular, morfolometrik bulgular ve bitki stres analizleri bulguları olmak üzere üç başlık altında ele alınmıştır.

4.1 Moleküler Bulgular

Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulanan *Vicia faba* bitkileri üzerinde geliştirilen *A. pisum* afit bireylerinde endosimbiyontların varlığının etkilenip etkilenmediğinin belirlenebilmesi için *Buchnera aphidicola* için spesifik olduğu bilinen primerler kullanılarak PZR çalışması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Buch16S1 primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri
K-1:Kontrol1 K-2:Kontrol2 AN-1:Amonyum Nitrat1 AN-2:Amonyum Nitrat2 ANC-1:Amonyum Nitrat+Antibiyotik1 ANC-2:Amonyum Nitrat2 AC-1:Amonyum Klorür1 AC-2:Amonyum Klorür2 ACC-1:Amonyum Klorür1 ACC-2:Amonyum Klorür2 SN-1:Sodyum Nitrat1 SN-2:Sodyum Nitrat2 SNC-1:Sodyum Nitrat1 SNC-2:Sodyum Nitrat2 CLO-1:Antibiyotik1 CLO-2:Antibiyotik2 673-1:Pozitif Kontrol1 673-2:Pozitif Kontrol2

Yapılan PZR çalışması neticesinde agaroz jel üzerinde DNA varlığı çalışılan grupların hepsinde (390-400bp) elde edilmiştir. *Buchnera* spesifik primerler kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi sonuçları *Buchnera* varlığını göstermektedir. Sekans analizlerinden elde edilen nükleotid dizilerinin FASTA uzantısı aşağıda sunulmuştur (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Sekans analizinden elde edilen nükleotid dizilerinin FASTA uzantısı

```
5'-  
GGGCGGGGGGGGTATATCTGGGGACTACCCAAAAGAGGGGGATAAC  
TACTAGAAATGGTAGCTAATACCGCATAAATGTTGAAAAACCAAAGTG  
GGGGACCTTTTGGCCTCATGCTTTTGGATGAACCCAGACGAGATTAG  
CTTGTGGTAGAGTAATAGCCTACCAAGGCAACGATCTCTAGCTGGT  
CTGAGAGGATAACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT  
GATGCAGCTATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGT  
ACTTTCAGCGGGGAGGAAAAAAAATAAACTAATAATTTATTTTCGTG  
ACGTTACCCGCAGAAGA-3'
```

Elde edilen sekanslar NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen bankası BLAST WEB programı ile analiz edilmiş ve dizinin % 99,74 ile *Buchnera aphidicola* türüne ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola/Macrosiphum euphorbiae strain Mas chromosome complete genome	693	693	96%	0.0	99.74%	CP033306.1
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola/Acyrthosiphon pisum isolate E1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	693	693	96%	0.0	99.74%	K0910801.1
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola/Acyrthosiphon pisum isolate C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	693	693	96%	0.0	99.74%	K0910802.1
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola/Acyrthosiphon pisum isolate C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	693	693	96%	0.0	99.74%	K0910799.1
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola/Acyrthosiphon pisum isolate A1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	693	693	96%	0.0	99.74%	K0910798.1
<input type="checkbox"/> Utricularia bacterivora strain nod2000b01s1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	693	693	96%	0.0	99.74%	F167727.1
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola str. TLV93/Acyrthosiphon pisum complete genome	693	693	96%	0.0	99.74%	CP022301.1
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola str. LL01/Acyrthosiphon pisum complete genome	693	693	96%	0.0	99.74%	CP022302.1
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola str. SA/Acyrthosiphon pisum complete genome	693	693	96%	0.0	99.74%	CP021161.1
<input type="checkbox"/> Buchnera aphidicola str. Tuk7/Acyrthosiphon pisum complete genome	693	693	96%	0.0	99.74%	CP021158.1

Şekil 4.2. Sekansların NCBI gen bankası BLAST analizi verileri

Ayrıca *Buchnera aphidicola* türüne ait karşılaştırmalı genom analizi de Şekil 4.3.' de sunulmuştur.

Download v GenBank Graphics				
Buchnera aphidicola (Macrosiphum euphorbiae) strain Meu chromosome, complete genome				
Sequence ID: CP033006.1 Length: 645334 Number of Matches: 1				
Range 1: 276232 to 276610 GenBank Graphics				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
693 bits(375)	0.0	378/379(99%)	1/379(0%)	Plus/Plus
Query 14	ATATCTGGGGA-CTACCCAAAAGAGGGGGATAACTACTAGAAATGGTAGCTAATACCGCA			72
Sbjct 276232	ATATCTGGGGATCTACCCAAAAGAGGGGGATAACTACTAGAAATGGTAGCTAATACCGCA			276291
Query 73	TAATGTTGAAAAACCAAAGTGGGGGACCTTTTGGCCTCATGCTTTTGGATGAACCCAGAC			132
Sbjct 276292	TAATGTTGAAAAACCAAAGTGGGGGACCTTTTGGCCTCATGCTTTTGGATGAACCCAGAC			276351
Query 133	GAGATTAGCTTGTGGTAGAGTAATAGCCTACCAAGGCAACGATCTCTAGCTGGTCTGAG			192
Sbjct 276352	GAGATTAGCTTGTGGTAGAGTAATAGCCTACCAAGGCAACGATCTCTAGCTGGTCTGAG			276411
Query 193	AGGATAACCAAGCCACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTG			252
Sbjct 276412	AGGATAACCAAGCCACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTG			276471
Query 253	GGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCTATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC			312
Sbjct 276472	GGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCTATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC			276531
Query 313	TTAGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAAAAAAAATAAACTAATAATTTTATTTTCG			372
Sbjct 276532	TTAGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAAAAAAAATAAACTAATAATTTTATTTTCG			276591
Query 373	TGACGTTACCCGAGAAGA	391		
Sbjct 276592	TGACGTTACCCGAGAAGA	276610		

Şekil 4.3. *B. aphidicola*'nın karşılaştırmalı genom analizi

Ancak literatüre göre Douglas ve Prosser 1992' de yaptıkları bir çalışmada klortetrasiklin uygulamasının *Acyrtosiphon pisum* afitlerinde endosimbiontu giderdiğini belirtilmiş olup, triptofan olmayan diyetle beslendiklerinde bu birinci nesil afitlerin öldükleri ifade edilmiştir. Afitlerde endosimbiontun giderildiğinin belirtilmesine karşın herhangi bir PZR çalışması ile gösterilmemiştir. Ancak uyguladıkları triptofan diyetli ortamda endosimbiont içeren afitlerin balsı maddelerinde triptofan varlığını teşhis ettiklerinde bunun endosimbiont bakteri kökenli olduğu ancak antibiyotikle muamele edilenlerde bunun gerçekleşmediği ifade edilmiştir. Buna dayanarak endosimbiontların triptofan gibi esansiyel aminoasitleri sentezlediği ve afitlerin bu nedenle endosimbionta ihtiyaç duydukları belirtilmiştir.

Farklı bir çalışmada ise endosimbiont popülasyonu ve konak-endosimbiont etkileşimlerinde antibiyotik uygulamalarının etkilerinin birinci nesil afitlerde tam olarak ortaya çıkmadığı gösterilmiştir (Koskinodi vd., 2019). *V. faba* bitkisi üzerinde yaklaşık 11 gün boyunca yetiştirilip klortetrasiklin antibiyotiğinin de dahil olduğu altı çeşit antibiyotik uygulanan afitlerde yapılmış bir araştırmada *Buchnera* eliminasyonunun ilk altı gün boyunca başarısız olduğu, ancak 11. gündeki PZR çalışmalarında rifampisin ve

terramisin uygulaması yapılan afitlerde *Buchnera*'nın elemine olduğu görülmüştür (Lv vd., 2018). Dolayısıyla sunulan çalışmada antibiyotik uygulamasından sonra hala endosimbiont *Buchnera* varlığının gözlemlenmesi daha önceki bazı çalışmalarla uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte endosimbiontun fonksiyonel olup olmadığına ilişkin herhangi bir “real – time” PZR çalışması yapılmadığından *Buchnera* varlığının etkinliğinin tam olarak ortaya konulmadığı söylenebilmektedir. PZR ile gösterilen genomun varlığı *Buchnera*'nın fonksiyonel olup olmadığına ilişkin herhangi bir bilgi vermediğinden dolayı sunulan PZR çalışması *Buchnera*'nın etkinliğini ortaya koymak açısından yetersiz kalmaktadır. Bu etkinliğin ortaya konulabilmesi triptofan ve fenilalanin gibi amino asitlerin sentezinden sorumlu bazı enzimlerin afitlerde aktif olarak çalışıp çalışmadığı “real time” PZR uygulaması ve daha uzun süreli antibiyotik uygulaması çalışmaları ile ortaya konulabilir.

4.2 Morfometrik Bulgular

Laboratuvar çalışmaları sonucunda *A. pisum* bireylerinin morfolojik özellikleri üzerine bitkiye uygulanan farklı azot kaynakları ve antibiyotiğin etkisini incelemek amacıyla 177 kanatsız birey üzerinden temel morfolojik karakterlerin ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Ek-A). Her birey için farklı sayıda morfometrik karakter ölçümü yapılmış olup ölçülen karakterlerin ortalamaları ile standart sapmaları hesaplanarak analizleri yapılmak üzere tablo haline getirilmiştir. Ölçümler yapılırken ergin olmayan ve kanatlı bireyler dikkate alınmamıştır. Temel morfolojik karakterlerin ölçümünü takiben değişik solüsyonların bilateral karakterlerde herhangi bir gelişim bozukluğuna yol açıp açmadığını belirleyebilmek için karakterlerin sağ ve sol uzunluk ölçümleri arasındaki farklılık tespit edilmiş ve literatüre uyumlu bir şekilde gelişim bozukluğu (FA) olarak ifade edilmiştir.

4.2.1 Temel morfolojik karakterler

Farklı solüsyonların *A. pisum* popülasyonlarının ölçülen morfolojik karakterleri üzerine etkisini ortaya koymak için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testi uygulanmıştır. Ölçülen 11 karakterden altı tanesi (ANT3, PT, Base, HT3, HT1, ANTT) üzerinde solüsyonların istatistiksel açıdan anlamlı farklılığa yol açtığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. *A. pisum* popülasyonunun morfolojik karakterleri üzerine farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisi (Tek Yönlü ANOVA, $p < 0.05$)

Karakter		Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Önemlilik
BL	Grup içi	26335,504	7	3762,215	1,343	0.235
	Gruplar arası	364042,03	130	2800,323		
	Toplam	390377,53	137			
CAUDA	Grup içi	848,554	7	121,222	1,165	0.326
	Gruplar arası	16030,806	154	104,096		
	Toplam	16879,36	161			
URS	Grup içi	0	7	0	1,008	0.427
	Gruplar arası	0,008	161	0		
	Toplam	0,008	168			
SIP	Grup içi	3843,873	7	549,125	1,536	0.159
	Gruplar arası	52541,369	147	357,424		
	Toplam	56385,242	154			
ANT3	Grup içi	0,628	7	0,09	3,475	0.002
	Gruplar arası	2,943	114	0,026		
	Toplam	3,571	121			
PT	Grup içi	0,438	7	0,063	4,233	0.001
	Gruplar arası	1,124	76	0,015		
	Toplam	1,562	83			
Base	Grup içi	0,037	7	0,005	5,565	0.000
	Gruplar arası	0,099	106	0,001		
	Toplam	0,136	113			
PT/Base	Grup içi	1,471	7	0,21	1,538	0,167
	Gruplar arası	10,379	76	0,137		
	Toplam	11,849	83			
ANTT	Grup içi	12,391	7	1,77	6,618	0.000
	Gruplar arası	20,328	76	0,267		
	Toplam	32,719	83			
HT3	Grup içi	2,654	7	0,379	2,684	0.013
	Gruplar arası	18,36	130	0,141		
	Toplam	21,013	137			
HT1	Grup içi	0,002	7	0	2,414	0.024
	Gruplar arası	0,016	111	0		
	Toplam	0,019	118			

Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının *A. pisum* popülasyonlarının morfolojik karakterleri üzerine istatistiksel açıdan anlamlı etkide bulunduğu belirlenmesinin ardından bu farklılığın oluşmasında hangi solüsyonun etkili olduğunu ortaya koymak amacıyla Çoklu Varyans Analizi Tukey, Post-Hoc testi uygulanmıştır.

Çoklu varyans analizi sonuçlarına göre bu karakterlerin farklılığında solüsyonların istatistiksel açıdan önemli etkide bulunduğu görülmüştür (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. *A. pisum* popülasyonunun morfolojik karakterleri üzerine farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi (Çoklu Karşılaştırma Analizi, Tukey Post-Hoc testi, $p < 0.05$)

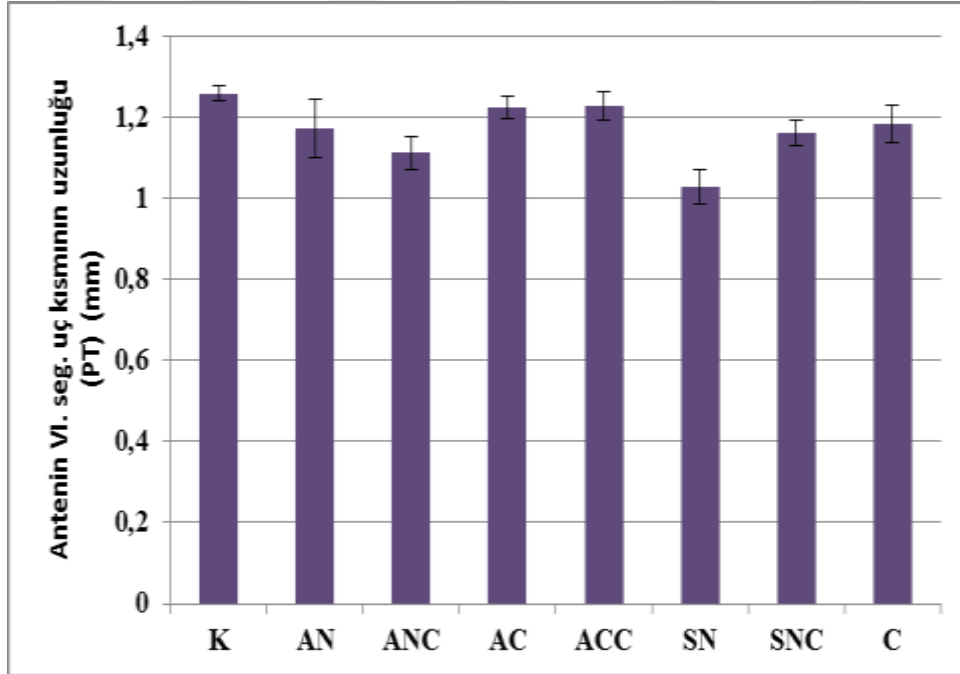
Karakter	(I) Solüsyon	(J) Solüsyon	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	Önemlilik (p)	95% Güven Aralığı		
						Alt Sınır	Üst Sınır	
ANT3	K	SN	,24340*	,05784	,001	,0648	,4220	
	ANC	SN	,18577*	,06000	,049	,0005	,3710	
	AC	SN	,19410*	,05848	,026	,0135	,3747	
	ACC	SN	,24548*	,05920	,002	,0627	,4283	
	SN	K	K	-,24340*	,05784	,001	-,4220	-,0648
		ANC	K	-,18577*	,06000	,049	-,3710	-,0005
		AC	K	-,19410*	,05848	,026	-,3747	-,0135
		ACC	K	-,24548*	,05920	,002	-,4283	-,0627
PT	K	SN	,23077*	,04982	,000	,0755	,3860	
	AC	SN	,19455*	,05185	,008	,0329	,3562	
	ACC	SN	,20000*	,04827	,002	,0495	,3505	
	SN	K	K	-,23077*	,04982	,000	-,3860	-,0755
		AC	K	-,19455*	,05185	,008	-,3562	-,0329
		ACC	K	-,20000*	,04827	,002	-,3505	-,0495
Base	K	SN	,06418*	,01144	,000	,0288	,0996	
	AC	SN	,05113*	,01129	,000	,0162	,0860	
	ACC	SN	,04643*	,01129	,002	,0115	,0813	
	SN	K	K	-,06418*	,01144	,000	-,0996	-,0288
		AC	K	-,05113*	,01129	,000	-,0860	-,0162
		ACC	K	-,04643*	,01129	,002	-,0813	-,0115
ANTT	K	SN	1,24664*	,21187	,000	,5862	1,9070	
	AC	SN	1,02182*	,22053	,000	,3344	1,7092	
	ACC	SN	1,09418*	,20530	,000	,4543	1,7341	
	SN	K	K	-1,24664*	,21187	,000	-1,9070	-,5862
		AC	K	-1,02182*	,22053	,000	-1,7092	-,3344
		ACC	K	-1,09418*	,20530	,000	-1,7341	-,4543
		SNC	K	-,80318*	,22597	,014	-1,5075	-,0988
	SNC	SN	,80318*	,22597	,014	,0988	1,5075	
HT3	K	SN	,45737*	,12980	,013	,0575	,8573	
		C	,36782*	,11770	,044	,0052	,7304	
	SN	K	-,45737*	,12980	,013	-,8573	-,0575	
		C	-,36782*	,11770	,044	-,7304	-,0052	

Karakterlerde gözlenen bu farklılığın oluşmasında hangi solüsyon yada solüsyonların etkili olduğunu belirlemek için yapılan Çoklu Varyans Analizi testine göre *A. pisum*

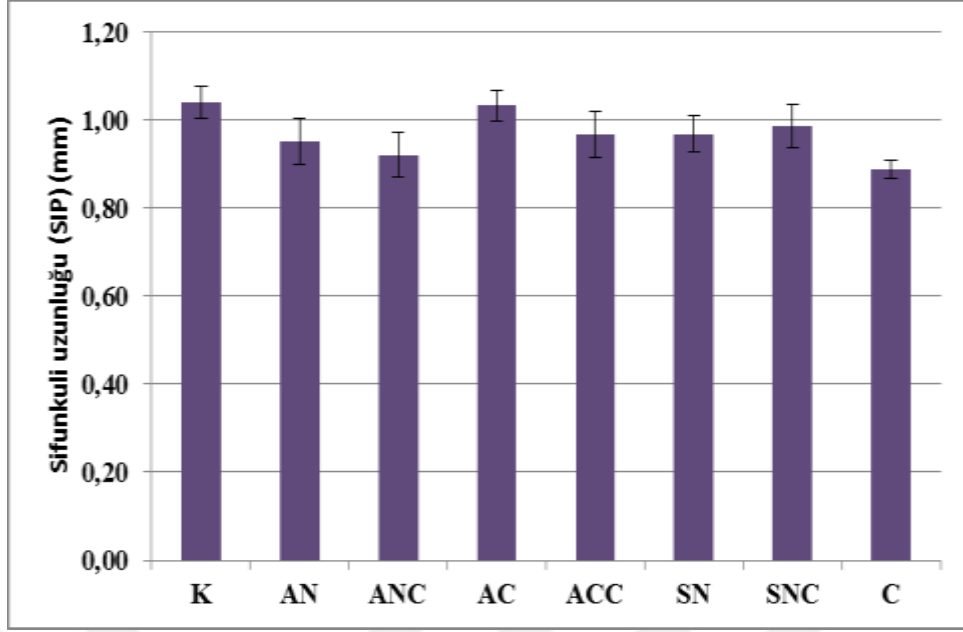
bireylerinin 5 morfometrik karakteri üzerinde özellikle SN (Sodyum Nitrat), SNC (Sodyum Nitrat ile antibiyotik) ve C (sadece antibiyotik) bulunan solüsyonların etkili olduğu Tukey Post-Hoc testi ile belirlenmiştir (Çizelge 4.3.).

Bu çerçevede ANT3 morfometrik karakterinde, kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada Tukey testi verilerine göre K (Kontrol) ile SN (Sodyum nitrat) arasında (Tukey HSD_[14,507]= 24.340 p=0,001) ve ACC (Amonyum klorür-Antibiyotik) ile SN (Sodyum nitrat) arasında (Tukey HSD_[14,507]= 24.548 p=0,002) istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu ortaya konulmuştur.

Ayrıca HT3 morfometrik karakterinde de, kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada Tukey testi verilerine göre K (Kontrol) ile SN (Sodyum nitrat) arasında (Tukey HSD_[16,953]= 45.737 p=0,013) istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu ortaya konulmuştur. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulaması yapılan *V. faba* bitkisi üzerinden örneklenen *A. pisum* popülasyonlarına ait 11 morfolojik karakter ölçülmüştür (Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6.).

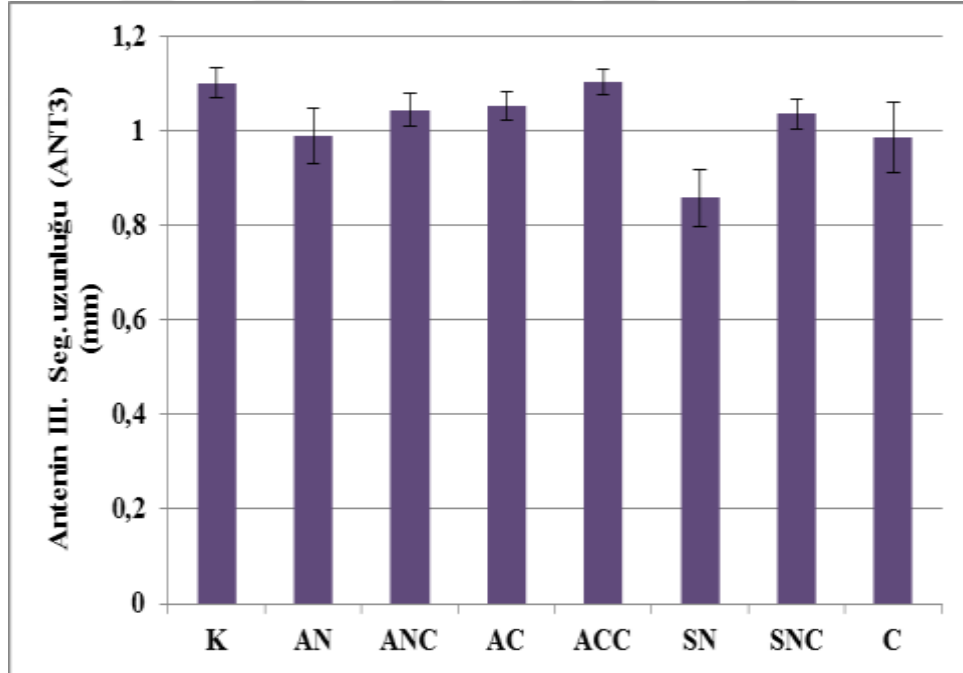


Şekil 4.4. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının *A. pisum* popülasyonlarının anten VI. segmentinin uç kısmının uzunluğu (PT) üzerine etkisi
K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik, AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik



Şekil 4.5. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının *A. pisum* popülasyonlarının sifunkuli uzunluğu (SIP) üzerine etkisi

K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik, AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

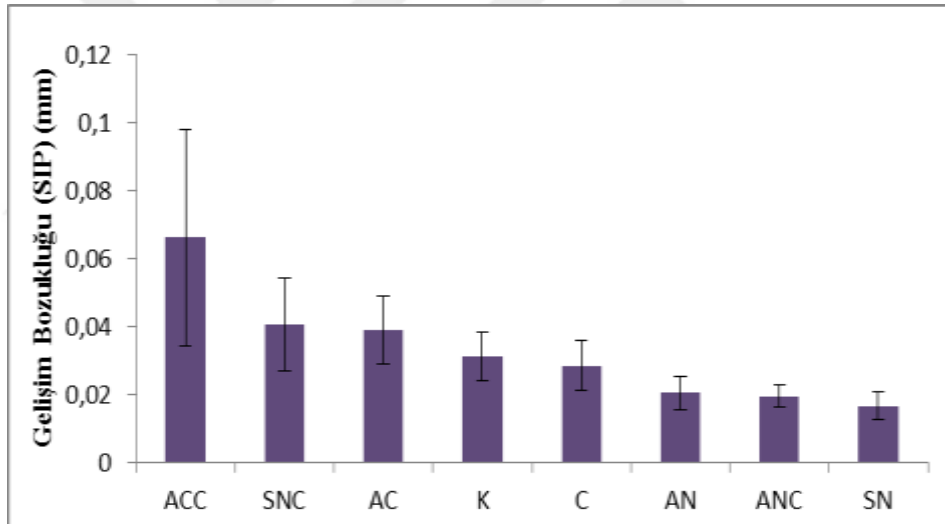


Şekil 4.6. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının *A. pisum* popülasyonlarının anten III. segment uzunluğu (ANTIII) üzerine etkisi

K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik, AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

4.2.2 Bilateral karakterlerde gelişim bozukluğu (FA)

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda birçok organizmanın ve afitlerin genellikle strese maruz kaldıklarında bilateral karakterlerinde gelişme bozuklukları gösterdikleri belirlenmiştir (Görür, 2006). Farklı azot kaynakları ve antibiyotik kullanılarak hazırlanan solüsyonların uygulandığı *V. faba* bitkileri üzerinde geliştirilen *A. pisum* bireylerinde benzer bir durumun olup olmadığının ortaya çıkarılması amacıyla sağda ve solda bulunan (bilateral) karakterlerinin morfometrik ölçümleri de gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8.). Yapılan ölçümlerin ortalamaları ve standart hata değerleri kullanılarak oluşturulan grafikler verilmiştir (Şekil 4.7., Şekil 4.9.). Kontrol grubu ile yapılan kıyaslamada sifunkuli uzunluğundaki gelişim bozukluğunun ACC (Amonyum Klorür-Antibiyotik) uygulamasında en fazla, SN (Sodyum Nitrat) uygulamasında en az olduğu görülmüştür (Şekil 4.7.).



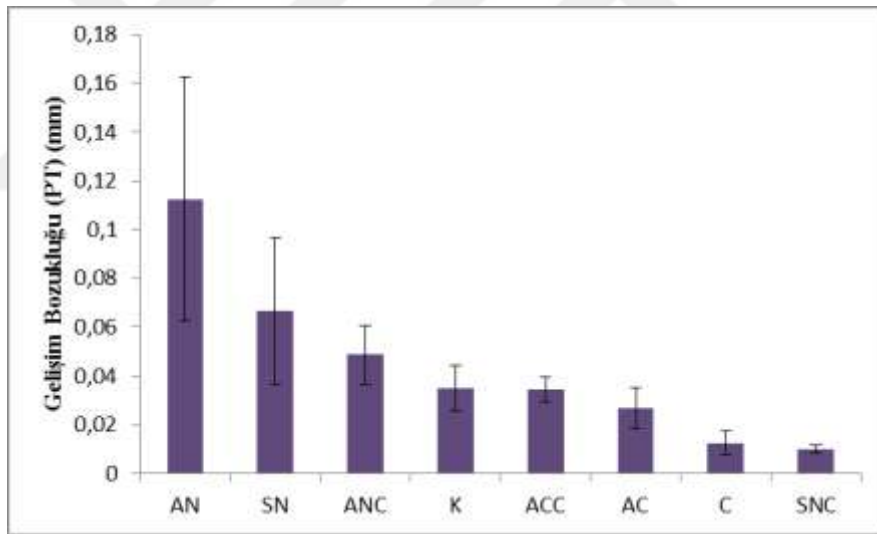
Şekil 4.7. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının *A. pisum* bireylerinde sifunkulinin gelişim bozukluğu üzerine etkisi

K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik, AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik



Şekil 4.8. ACC (NH_4Cl +Antibiyotik) uygulaması yapılan bitkilerden örneklenen *A. pisum* bireylerinde SIP gelişim bozukluğu

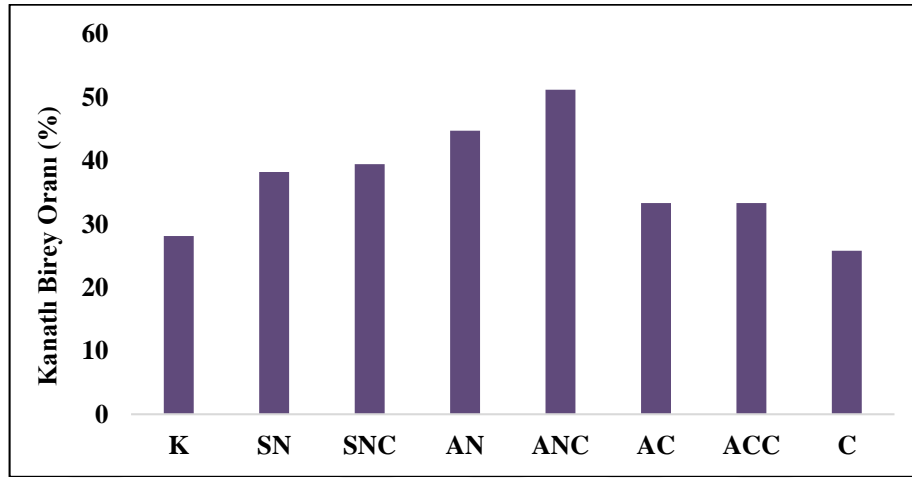
Antenin VI. segmentinin uç kısmının (PT) uzunluğundaki gelişim bozukluğu kontrol grubuna kıyasla AN (Amonyum Nitrat) uygulamasında daha fazla iken, SNC (Sodyum Nitrat-Antibiyotik) uygulamasında daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının *A. pisum* bireylerinde Anten VI. segmentinin uç kısmının (PT) gelişim bozukluğuna etkisi
 K:Kontrol, SN: NaNO_3 , SNC: NaNO_3 +Antibiyotik, AN: NH_4NO_3 , ANC: NH_4NO_3 +Antibiyotik, AC: NH_4Cl , ACC: NH_4Cl +Antibiyotik, C: Antibiyotik

Afitler konak bitki içeriğinde meydana gelen olumsuz değişimlere cevap olarak kanatlı birey sayısını artırmaktadır (Dixon,1998). Bu sebeple bu tez çalışmasında farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulaması yapılan *V. faba* bitkileri üzerinden örneklenen *A. pisum* popülasyonlarının kanatlı birey sayımları da gerçekleştirilmiş ve kanatlı birey oranları Şekil 4.10.' de verilmiştir. Genel olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında

sadece klortetrasiklin uygulaması yapılan bitkilerden örneklenen popülasyon dışında diğer bütün uygulamaların kanatlı birey oranını arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının *A. pisum* popülasyonlarının kanatlı birey oranı üzerine etkisi

K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik, AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

Afitlerde kanatlı birey sayısındaki artışın uygunsuz çevre koşullarıyla ilgili olduğu öne sürülmüş çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Müller vd., 2001; Ohtaka ve Ishikawa, 1991; Russell ve Moran, 2005). Bu çalışmada antibiyotik uygulama işleminden daha çok azot kaynaklarının bitki içeriğini değiştirdiğinden genel olarak kanatlı birey sayısını artırdığı söylenebilmektedir. Elde edilen veriler literatür ile uyumlu bulunmuştur.

4.3 Farklı Azot Kaynaklarının *Vicia faba* Bitkisinin İçeriğine Etkisi

Bitkiler abiyotik (tuzluluk, sıcaklık, aşırı sulama ve kuraklık gibi) ve biyotik (bakteri, virüs, böcek gibi) stres koşullarına stres hormonlarını ve sekonder metabolitleri sentezlemek gibi çeşitli metabolik cevaplar vermektedir (Gülen ve Eriş, 2004; He vd., 2005; Khan vd., 2010; Akhzari ve Pessarakli, 2016; Çördük vd., 2016).

Herbivor böceklere karşı bitkilerin çok fazla savunma mekanizmasının olduğu bunlar içinde sekonder metabolitlerin böcek ve patojenlere karşı en önemli kimyasal savunma mekanizmalarından olduğu ifade edilmektedir (Wink, 1988; Jander vd., 2001; Kim vd., 2008). Bazı çalışmalarda aşırı su stresinin bitkiler açısından kimyasal içeriği değiştiren ve bitkinin böceklere toleransını az veya çok yönde değiştirebilen en yaygın abiyotik

stres faktörü olduğu belirtilmiştir (Wearing, 1972; Khan vd., 2010). Kuraklık stresinin kullanıldığı Khan vd. (2010), çalışmasında brokoli, (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck (Brassicaceae)), çok sulanan, kuraklık ve suya dayanan koşullar altında yetiştirilmiş ve sekonder bir metabolit olan glikosinolat (GS) seviyeleri ve iki afit türünün (*Brevicoryne brassicae* ve *Myzus persicae*: Aphididae) performansını ne şekilde etkilediği araştırılmıştır. Her iki stres etkeninin brokoli bitkilerinde GS seviyelerini değiştirdiği belirlenmiştir. Kuraklık stresi altında 2 hafta kalan bitkilerle çok sulanan bitkilerin GS içerikleri karşılaştırıldığında, su stresinde brokoli bitkisinin GS içeriğinin değiştiği görülmüş, kuraklığın bitkilerde GS seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Suya doymuş bitkilerde ise GS seviyesinin biraz arttığı bununla birlikte floemindeki şeker içeriğinin de yüksek olduğu bulunmuştur. Her iki afit türünün bu iki farklı kaynaklı su stresine farklı cevaplar verdiği de tespit edilmiştir. *Brevicoryne brassicae* afiti su stresinden daha az etkilenmiş ve popülasyon büyüklüğünün çok değişmediği tespit edilmiştir. Kuraklıkta yer alan bitkinin *M. persicae* afit türünün popülasyon büyüklüğünün çok sulanmış bitkide yetişenlere göre sınırlandığı belirlenmiştir. Farklı işlemlere tabi tutulan bitkilerde benzer popülasyon büyüklükleri bulunmuştur. Kovaryans analizi, bitkilerin su durumunun önemli bir etkisi olduğunu göstermiş, ancak GS içeriğinin *M. persicae* afit performansı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı elirlenmiştir. Bununla birlikte, önceden alıştırmış *B. brassicae* afiti, su stresi koşulları altında indüklenen değişikliklerden çok fazla etkilenmediği ortaya konmuştur (Khan vd., 2010).

Bitkilerin sentezlediği sekonder metabolitler çok sayıda ve farklı özelliklerde olup fenolikler, terpenler, steroidler ve alkaloidler gibi bileşiklerden oluşmaktadır (Bourgand vd., 2001). Stres karşısında özellikle herbivor böceklerle karşı sentezlenenler içerisinde azot içeren fenolik bileşikler başta olmak üzere çok sayıda bileşiğin sentezlendiği, hatta proteinlerde bulunmayan L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) amino asidinin *Vicia faba* bitkisinde yüksek düzeyde bulunduğu belirtilmiştir. L-DOPA şikimik asit metabolik yolunda fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik amino asitlerden sentezlendiği ve böcek saldırılarında *V. faba* bitkisinin vakuollerinde biriktirildiği bildirilmiştir. Bitkiler tarafından üretilen L-DOPA gibi fenolik bileşiklerin savunma mekanizması olarak küçük memeli ve böcekler üzerinde kovucu etkisi bulunduğu, böcek larvaları üzerinde yapılan denemelerde önemli miktarda ölümlere neden olduğu da belirtilmiştir. Bu proteinde bulunmayan amino asidin herbivor böceklerin hem larva

hem de erginleri tarafından metabolize edilemediği tespit edilmiştir (Soares vd., 2014). Genellikle, kuraklık stresi de bitkilerin kimyasal bileşimini değiştirmekte böcek zararlılarına karşı bitkilerin toleranslarını etkileyebilmektedir. Kuraklık stresine bitki kimyasal tepkilerini değerlendirmek için çeşitli parametrelerin araştırılması gerektiği ifade edilmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmada da bitkilere uygulanan azot kaynakları ile antibiyotiklerin bitki öz suyu ile beslenen afitlerin morfolojik karakterlerinde farklılıklara yol açabileceği öngörülmüştür. Ayrıca bitki üzerinde afitlerin bulunmasının bitkide strese neden olabileceği, bu farklı solüsyonlardan bitkinin olumlu ya da olumsuz etkilenebileceği düşünülmüş ve bu açıdan bitkide stres göstergesi olan temel analizler gerçekleştirilmiştir. Farklı azot kaynağı içeren solüsyonların *A. pisum* popülasyonlarının konak bitki içeriği üzerine etkisini ortaya koymak için “Tek Yönlü Varyans Analizi” (ANOVA) testi uygulanmıştır. Yapılan analizlerde farklı azot kaynağı ve antibiyotik uygulamasının konak bitki içeriğinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılığa yol açtığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4., Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.4. *V. faba* bitkisinde yapılan analizlerde farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisi (Tek Yönlü ANOVA, $p < 0.05$)

		Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Önemlilik
klorofil a	Gruplar arası	138,896	7	19,842	4,189	,008
	Grup içi	75,782	16	4,736		
	Toplam	214,678	23			
klorofil b	Gruplar arası	16,190	7	2,313	4,138	,009
	Grup içi	8,943	16	,559		
	Toplam	25,134	23			
toplam klorofil	Gruplar arası	211,751	7	30,250	4,547	,006
	Grup içi	106,454	16	6,653		
	Toplam	318,205	23			
prolin	Gruplar arası	2257,433	7	322,490	27,435	,000
	Grup içi	188,075	16	11,755		
	Toplam	2445,508	23			
protein	Gruplar arası	1,861	7	,266	9,210	,000
	Grup içi	,462	16	,029		
	Toplam	2,323	23			
SOD	Gruplar arası	58,135	7	8,305	6,973	,001
	Grup içi	19,057	16	1,191		
	Toplam	77,192	23			
CAT	Gruplar arası	599,046	7	85,578	64,322	,000
	Grup içi	21,287	16	1,330		
	Toplam	620,333	23			
Karotenoid	Gruplar arası	943,819	7	134,831	3,152	,027
	Grup içi	684,511	16	42,782		
	Toplam	1628,329	23			

Çizelge 4.5. *V. faba* bitkisinin fenolik bileşik miktarı üzerine farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisi (Tek Yönlü ANOVA, $p < 0.05$)

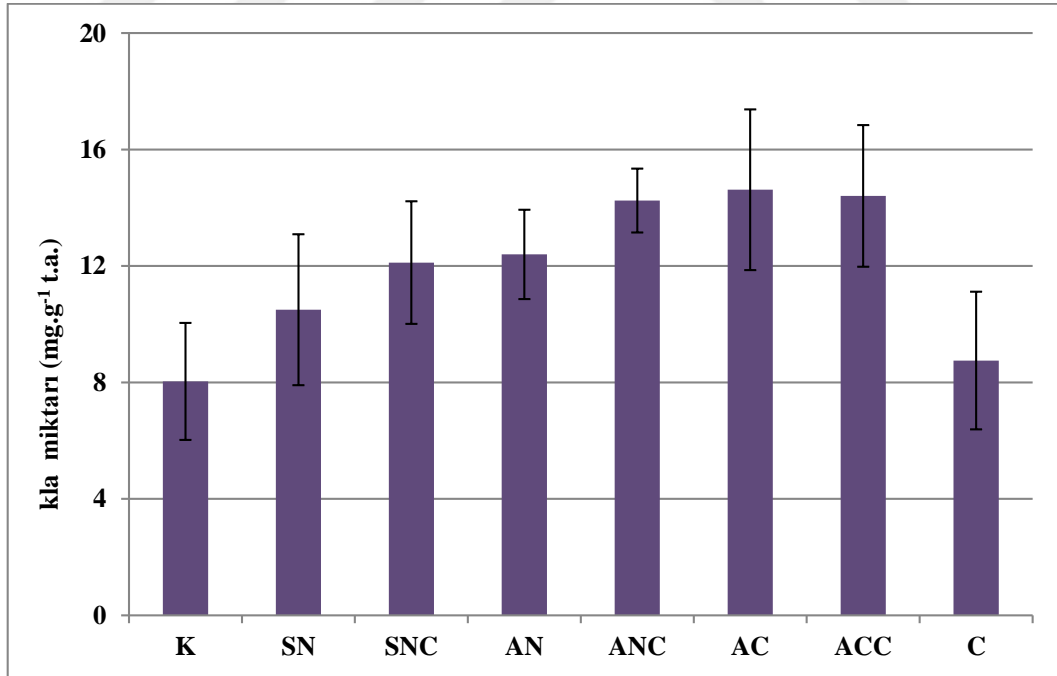
Fenolik	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	P Önemlilik
Gruplar arası	263773,263	7	37681,895	2,244	,086
Grup içi	268711,730	16	16794,483		
Toplam	532484,993	23			

ANOVA testi sonuçlarında tespit edilen farklılığın hangi solüsyon ya da solüsyonlardan kaynaklandığını ortaya koyabilmek için Çoklu Varyans Analizi Tukey, Post-Hoc testi uygulanmıştır. Çoklu varyans analizi sonuçlarına göre bitkiye uygulanan solüsyonların bitki içeriğine farklı şekillerde etkide bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6., Çizelge 4.7., Çizelge 4.8., Çizelge 4.9., Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.6. *Vicia faba* bitkisinin fotosentetik pigment miktarına farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi (Çoklu Karşılaştırma Analizi, Tukey Post-Hoc testi, $p < 0.05$)

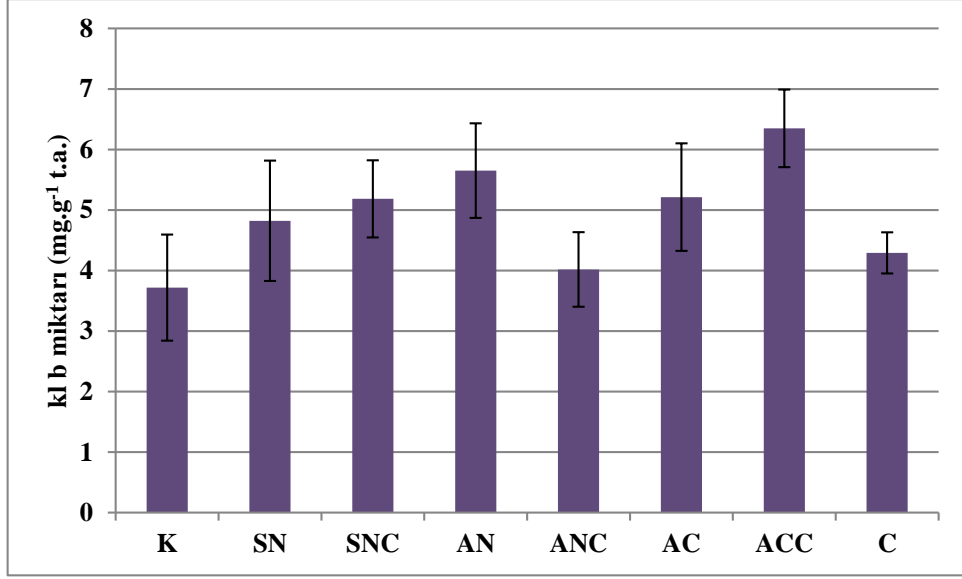
	(I) Solüsyon	(J) Solüsyon	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	Önemlilik (P)	95% Güven Aralığı	
						Alt Sınır	Üst Sınır
Klorofil a	K	ANC	-6,2140200*	1,7769629	,047	-12,366133	-,061907
		AC	-6,5853600*	1,7769629	,032	-12,737473	-,433247
		ACC	-6,3711367*	1,7769629	,040	-12,523250	-,219023
	ANC	K	6,2140200*	1,7769629	,047	,061907	12,366133
	AC	K	6,5853600*	1,7769629	,032	,433247	12,737473
	ACC	K	6,3711367*	1,7769629	,040	,219023	12,523250
Klorofil b	K	ACC	-2,6321400*	,6104466	,010	-4,745598	-,518682
	ANC	ACC	-2,3310050*	,6104466	,025	-4,444463	-,217547
	ACC	K	2,6321400*	,6104466	,010	,518682	4,745598
		ANC	2,3310050*	,6104466	,025	,217547	4,444463
Toplam klorofil	K	AC	-8,0819400*	2,1060834	,024	-15,373518	-,790362
		ACC	-9,0032767*	2,1060834	,010	-16,294855	-1,711698
	AC	K	8,0819400*	2,1060834	,024	,790362	15,373518
	ACC	K	9,0032767*	2,1060834	,010	1,711698	16,294855
		C	7,7099467*	2,1060834	,034	,418368	15,001525
	C	ACC	-7,7099467*	2,1060834	,034	-15,001525	-,418368

Farklı azot kaynakları ve antibiyotik kullanılarak hazırlanan solüsyonların uygulandığı *V. faba* bitkilerinin yaprakları kullanılarak fotosentetik pigment tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid değerlerinin tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmüştür. En yüksek artışlar % 81,96 ile klorofil a' da AC (Şekil 4.11.), klorofil b' de % 70,82 ile (Şekil 4.12.), toplam klorofilde % 76,62 ile (Şekil 4.13.) ve karotenoidde % 46,96 ile (Şekil 4.14.) ACC uygulamalarında meydana gelmiştir. Karotenoid miktarındaki en yüksek artış dışındaki artışlar önemlilik derecesindedir ($p < 0.05$). Karotenoidler pek çok bitkisel organda birikebilen izopirenoide yolla üretilen lipofilik sekonder metabolitlerdir. Aşırı çevresel şartlara karşı (fotoprotektif olarak) bitkinin dirençli olmasını sağladığı ifade edilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda stres koşullarının özellikle kuraklık ve tuz stres koşullarında kontrol gruplara kıyasla test edilen bitkilerde fotosentetik pigmentlerin çoğunda olduğu gibi karotenoid pigment içeriğinin azaldığı gösterilmiştir (Strzalka vd., 2003; Norshazila vd., 2017). Bu çalışmada, stres koşulları farklı olduğundan klorofil ve karotenoid pigment içeriği kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur.

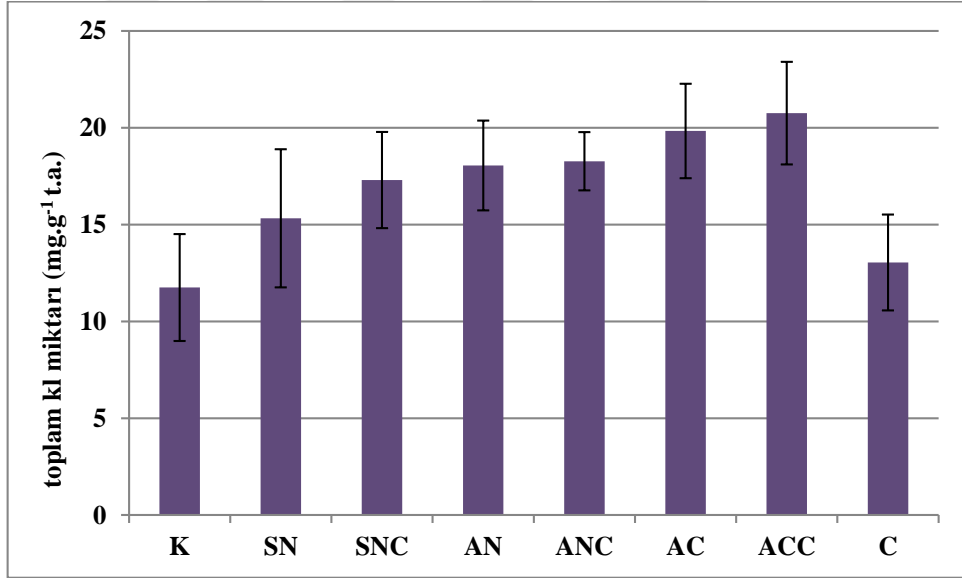


Şekil 4.11. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının klorofil-a miktarları

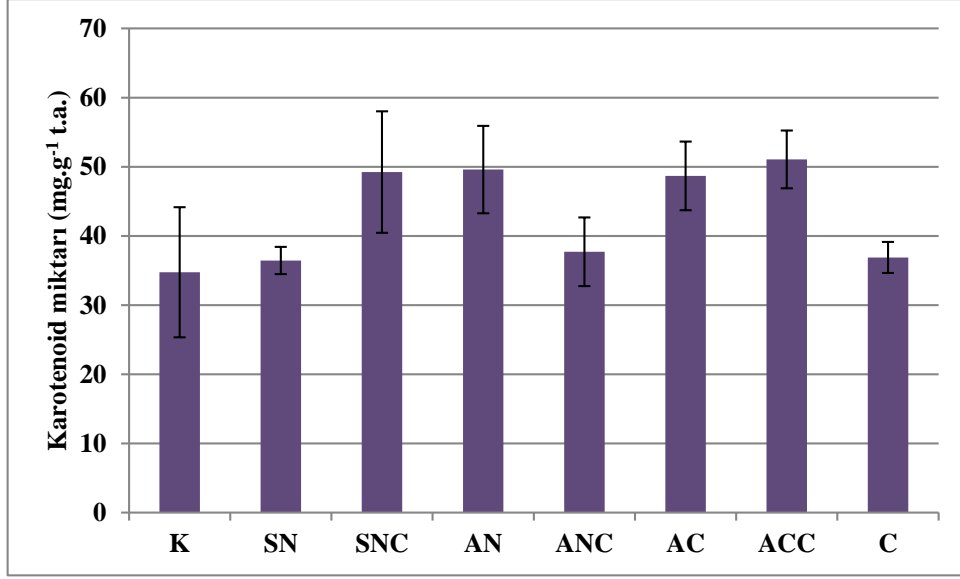
K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik, AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik



Şekil 4.12. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının klorofil-b miktarları
 K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik,
 AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik



Şekil 4.13. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının toplam klorofil miktarları
 K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik,
 AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

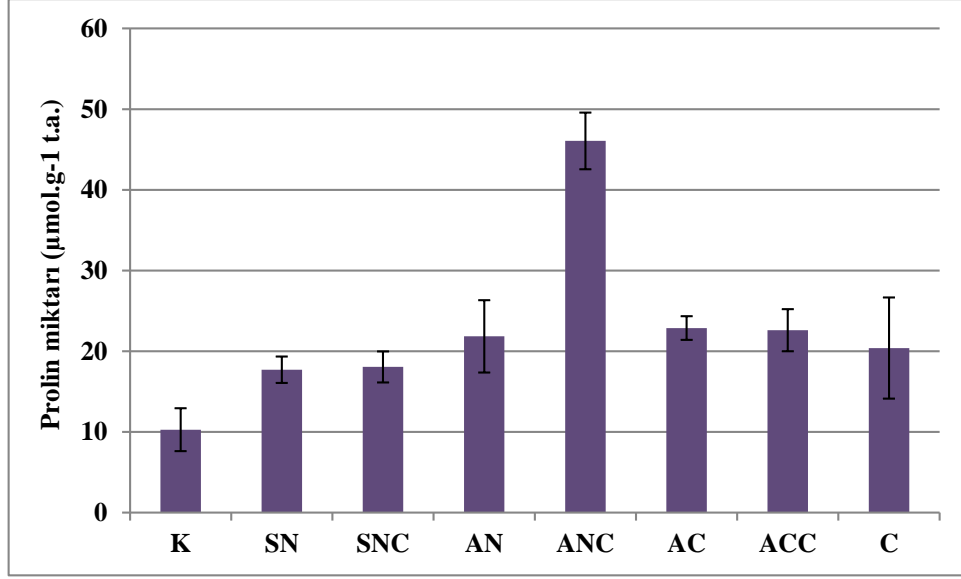


Şekil 4.14. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının karotenoid miktarları
 K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik,
 AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

Vicia faba bitkisinde prolin ve protein içeriği incelenmiş ve farklı azot kaynaklarının etkisi istatistiki açıdan da ortaya konmaya çalışılmıştır (Çizelge 4.7). Prolin miktarı tayini, stres derecesinin belirlenmesinde çok sık kullanılan bir parametredir. Birçok bitkide, serbest prolin, çok çeşitli biyotik ve abiyotik streslerde bitkinin savunma mekanizması sonucu birikerek ozmotik basıncı ayarlayan, hücrel bileşenleri stabilize eden ve radikal yükleri temizleyen bir bileşen olarak ortaya çıkan etkili bir stres parametresi olarak değerlendirilir. Yapılan çalışmalarda prolin metabolizmasında stresle ilgili değişmelerin bitkide gen ifadesinin kontrolünü etkileyebileceği belirtilmiştir. Hare ve Cress, (1997), çalışmalarında güve fasulyesinde prolin amino asidinin, ornitin delta aminotransferazı kodlayan geni aktive ettiği ve bu sayede redoks sisteminde fosforilasyon için gerekli döngüyü sağlayarak hem karbon hem de azot metabolizmasının devamını sağladığı tespit etmişlerdir. Ayrıca prolin metabolizmasında görevli delta amino transferaz enziminin bitkiye azot girişini aktive ettiği de belirtilmiştir. Özellikle stres koşullarında bitkide miktarı hızla artan ve bitkiyi olağandışı koşullara karşı koruyan prolin aminoasidinin miktarının kontrol grubuna oranla diğer bütün uygulama gruplarında arttığı tespit edilmiştir. En yüksek değer önemlilik derecesinde olan 46,06841 $\mu\text{mol. g}^{-1}$ t.a. ile ANC uygulanmasında saptanmıştır (Şekil 4.15.).

Çizelge 4.7. *Vicia faba* bitkisinin prolin ve protein konsantrasyonlarına farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi (Çoklu Karşılaştırma Analizi, Tukey Post-Hoc testi, $p < 0.05$)

	(I) Solüsyon	(J) Solüsyon	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	Önemlilik (P)	95% Güven Aralığı	
						Alt Sınır	Üst Sınır
Prolin	K	AN	-11,5671033*	2,7993671	,014	-21,258934	-1,875272
		ANC	-35,7890773*	2,7993671	,000	-45,480908	-26,097246
		AC	-12,5935880*	2,7993671	,007	-22,285419	-2,901757
		ACC	-12,3331367*	2,7993671	,008	-22,024968	-2,641306
		C	-10,1116400*	2,7993671	,038	-19,803471	-,419809
	SN	ANC	-28,3585540*	2,7993671	,000	-38,050385	-18,666723
	SNC	ANC	-28,0061787*	2,7993671	,000	-37,698010	-18,314348
	AN	K	11,5671033*	2,7993671	,014	1,875272	21,258934
		ANC	-24,2219740*	2,7993671	,000	-33,913805	-14,530143
	ANC	K	35,7890773*	2,7993671	,000	26,097246	45,480908
		SN	28,3585540*	2,7993671	,000	18,666723	38,050385
		SNC	28,0061787*	2,7993671	,000	18,314348	37,698010
		AN	24,2219740*	2,7993671	,000	14,530143	33,913805
		AC	23,1954893*	2,7993671	,000	13,503658	32,887320
		ACC	23,4559407*	2,7993671	,000	13,764110	33,147772
		C	25,6774373*	2,7993671	,000	15,985606	35,369268
	AC	K	12,5935880*	2,7993671	,007	2,901757	22,285419
		ANC	-23,1954893*	2,7993671	,000	-32,887320	-13,503658
	ACC	K	12,3331367*	2,7993671	,008	2,641306	22,024968
		ANC	-23,4559407*	2,7993671	,000	-33,147772	-13,764110
C	K	10,1116400*	2,7993671	,038	,419809	19,803471	
	ANC	-25,6774373*	2,7993671	,000	-35,369268	-15,985606	
Protein	K	SN	,7449300*	,1387410	,001	,264588	1,225272
		ANC	,8621430*	,1387410	,000	,381801	1,342485
		AC	,6218430*	,1387410	,007	,141501	1,102185
		C	,6504120*	,1387410	,005	,170070	1,130754
	SN	K	-,7449300*	,1387410	,001	-1,225272	-,264588
		ACC	-,5564280*	,1387410	,018	-1,036770	-,076086
	AN	ANC	,5582970*	,1387410	,017	,077955	1,038639
	ANC	K	-,8621430*	,1387410	,000	-1,342485	-,381801
		AN	-,5582970*	,1387410	,017	-1,038639	-,077955
		ACC	-,6736410*	,1387410	,003	-1,153983	-,193299
	AC	K	-,6218430*	,1387410	,007	-1,102185	-,141501
	ACC	SN	,5564280*	,1387410	,018	,076086	1,036770
		ANC	,6736410*	,1387410	,003	,193299	1,153983
	C	K	-,6504120*	,1387410	,005	-1,130754	-,170070

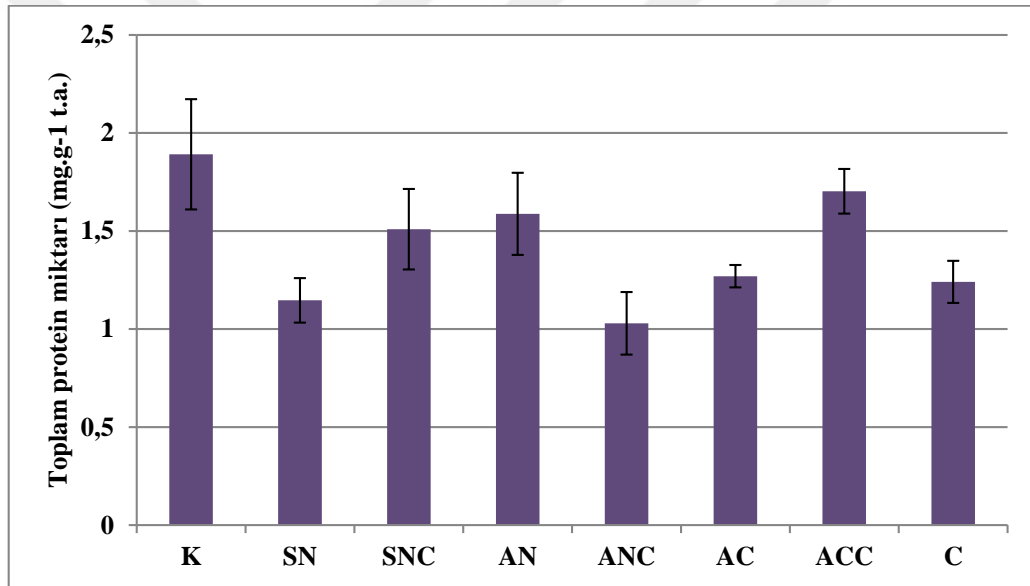


Şekil 4.15. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının prolin miktarları
 K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik,
 AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

Bitkilere uygulanan farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının bitkide strese yol açması ihtimali üzerinde durularak gerçekleştirilen toplam protein miktarları analizinden elde edilen grafik Şekil 4.16.' de verilmiştir. Literatüre göre, bitkilerde toplam protein içeriğinin stresli koşullarda düştüğü ifade edilmekte olup, bitkilerin stres koşullarında toplam protein içeriklerinin azaldığı bilinmektedir (Gülen ve Eriş, 2004; He vd., 2005; Akhzari ve Pessaraki, 2015; Çördük vd., 2016). Bu tez çalışmasında da literatür ile uyumlu olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm uygulama gruplarında toplam protein miktarında azalmalar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.16.). Literatürde tavus otlarında yapılan bir çalışmada özellikle sıcaklık stresinin proteaz aktivitesinin toplam protein içeriğiyle negatif bir korelasyon gösterdiği, bu durumun stres koşullarında serbest radikal yükleri tutmakla görevli amino asit içeriğini artırmaya dönük olarak proteinlerin parçalanmasına dayandığı şeklinde yorumlanmıştır (He vd., 2005). Ayrıca afitlerde tükürükte yapılan bir çalışmada tükürük içeriğinde çok sayıda enzim (bitki hücre duvarını parçalayan pektinazlar, selülaz benzerleri) ve protein bulunduğu tespit edilmiş ve bu proteinlerin bitki savunmasını baskılayıcı olabileceği belirtilmiştir. Tükürükteki proteazların floem proteinlerini parçalayarak afit besin kalitesini artırdığı, konak savunmasını kırdığı veya organik azotlu bileşiklerin elverişliliğini artırdığı ve bitki fenolik bileşiklerini detoksifiye ettiği ifade edilmiştir. Bunlardan GroEl proteininin afit endosimbiontu *Buchnera*' dan kaynaklandığı ve bunun

bitki savunma cevaplarını teşvik eden bir boşaltım ürünü olabileceği belirtilmiştir (Ma vd., 1990; Madhusudhan ve Miles, 1998; Carolan vd., 2009; Bel ve Will, 2016).

Bu tez çalışmasında, konak bitki protein içeriği bakımından en fazla azalmanın % 45,58 ile ANC uygulamasında olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Stres koşullarında literatür ile uyumlu olarak bitki floeminde yer alan proteinlerin azalması afit istilası nedeniyle olabileceği gibi bitkinin strese girmesi nedeniyle fenilalanin ve triptofan gibi aromatik aminoasitlerden fenolik madde üretmesi nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. Afite proteazlarının bitki floem proeinlerinin parçalanmasında kullanıldığı ve bitki savunması için fenolik madde üretiminde kullanılabileceği literatürde de belirtilmiştir (Baque vd., 2010, Furch vd., 2015).



Şekil 4.16. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının toplam protein miktarları
K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik, AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

Bitkide farklı azot kaynaklarının antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerine bakılmış ve istatistiki açıdan veriler Çizelge 4.8. ve Çizelge 4.9.' da değerlendirilmiştir. Bitkilerin stres koşullarında strese yanıt olarak antioksidan enzimlerin (Süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz) arttığı da belirtilmiştir (Gülen ve Eriş, 2004, He vd., 2005, Çördük vd., 2016). Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimi aktivitelerinde uygulama gruplarında kontrol grubuna kıyasla artışlar tespit edilmiştir. En yüksek artışın SOD aktivitesinde % 59,48 ile C uygulamasında (Şekil 4.17.), CAT

aktivitesinde % 168,38 ile AC uygulamasında (Şekil 4.18.) olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

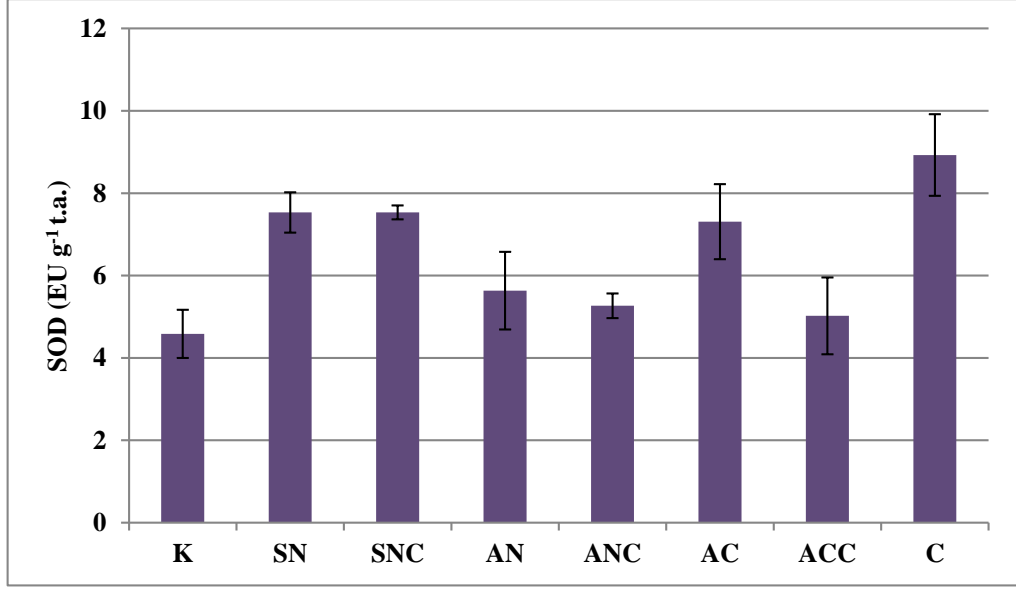
Yapılan bir çalışmada iki afit türünün böceğe hassas bir mısır (*Zea mays*) türü ve böceğe direnci olan diğer bir mısır türünün afit saldırısında SOD aktiviteleri karşılaştırılmış ve dirençli mısır türünün afit saldırısında SOD aktivitesinin diğer mısırdakine göre daha düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada tüm solüsyonların SOD aktivitesini artırdığı görülmüştür. Benzer şekilde katalaz enzim aktivitesi ile ilgili çalışmalarda bitkinin strese yanıt olarak ürettiği tespit edilmiştir (Sytykiewicz, 2014).

Çizelge 4.8. *Vicia faba* bitkisinin SOD enzim aktivitesinde farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi (Çoklu Karşılaştırma Analizi, Tukey Post-Hoc testi, p< 0.05)

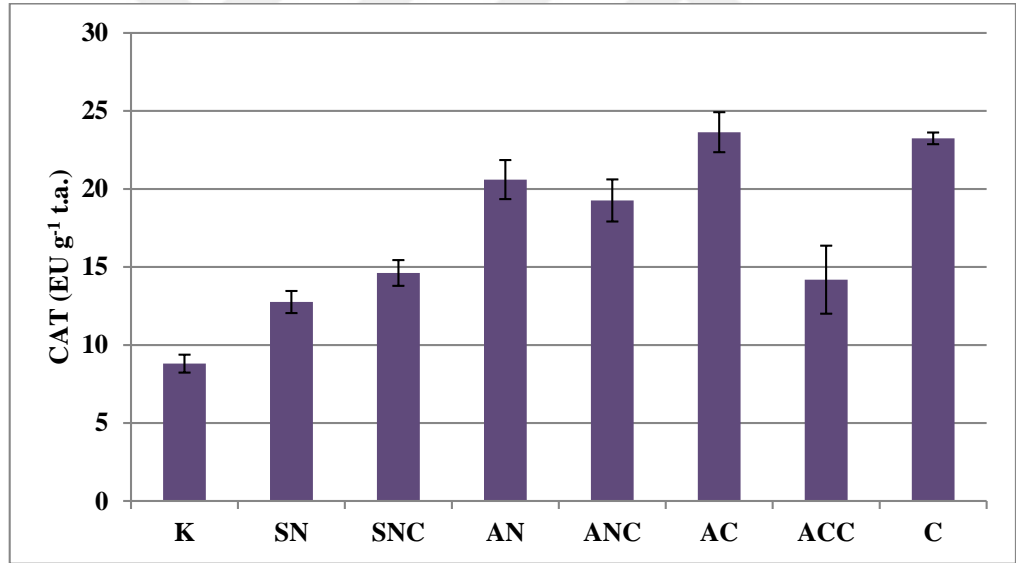
	(I) Solüsyon	(J) Solüsyon	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	Önemli lik (P)	95% Güven Aralığı	
						Alt Sınır	Üst Sınır
SOD	K	C	-3,5790201*	,8910859	,017	-6,664094	-,493946
	SN	ANC	3,3061554*	,8910859	,031	,221082	6,391229
	SNC	ANC	3,3074782*	,8910859	,031	,222404	6,392552
	AN	C	-3,8972941*	,8910859	,009	-6,982368	-,812220
	ANC	SN	-3,3061554*	,8910859	,031	-6,391229	-,221082
		SNC	-3,3074782*	,8910859	,031	-6,392552	-,222404
		C	-4,7005240*	,8910859	,002	-7,785598	-1,615450
	ACC	C	-3,9047254*	,8910859	,009	-6,989799	-,819652
	C	K	3,5790201*	,8910859	,017	,493946	6,664094
		AN	3,8972941*	,8910859	,009	,812220	6,982368
		ANC	4,7005240*	,8910859	,002	1,615450	7,785598
		ACC	3,9047254*	,8910859	,009	,819652	6,989799

Çizelge 4.9. *Vicia faba* bitkisinin CAT enzim aktivitesinde farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi (Çoklu Karşılaştırma Analizi, Tukey Post-Hoc testi, $p < 0.05$)

	(I) Solüsyon	(J) Solüsyon	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	Önemlilik (P)	95% Güven Aralığı	
						Alt Sınır	Üst Sınır
CAT	K	SN	-3,9507974*	,9417935	,012	-7,211428	-,690167
		SNC	-5,8090202*	,9417935	,000	-9,069651	-2,548389
		AN	-11,7941010*	,9417935	,000	-15,054732	-8,533470
		ANC	-10,4571512*	,9417935	,000	-13,717782	-7,196520
		AC	-14,8283171*	,9417935	,000	-18,088948	-11,567686
		ACC	-5,3793854*	,9417935	,001	-8,640016	-2,118755
		C	-14,4374725*	,9417935	,000	-17,698103	-11,176842
	SN	K	3,9507974*	,9417935	,012	,690167	7,211428
		AN	-7,8433036*	,9417935	,000	-11,103935	-4,582673
		ANC	-6,5063538*	,9417935	,000	-9,766985	-3,245723
		AC	-10,8775197*	,9417935	,000	-14,138151	-7,616889
		C	-10,4866751*	,9417935	,000	-13,747306	-7,226044
	SNC	K	5,8090202*	,9417935	,000	2,548389	9,069651
		AN	-5,9850809*	,9417935	,000	-9,245712	-2,724450
		ANC	-4,6481310*	,9417935	,003	-7,908762	-1,387500
		AC	-9,0192969*	,9417935	,000	-12,279928	-5,758666
		C	-8,6284524*	,9417935	,000	-11,889083	-5,367821
	AN	K	11,7941010*	,9417935	,000	8,533470	15,054732
		SN	7,8433036*	,9417935	,000	4,582673	11,103935
		SNC	5,9850809*	,9417935	,000	2,724450	9,245712
		ACC	6,4147156*	,9417935	,000	3,154085	9,675347
	ANC	K	10,4571512*	,9417935	,000	7,196520	13,717782
		SN	6,5063538*	,9417935	,000	3,245723	9,766985
		SNC	4,6481310*	,9417935	,003	1,387500	7,908762
		AC	-4,3711659*	,9417935	,005	-7,631797	-1,110535
		ACC	5,0777657*	,9417935	,001	1,817135	8,338397
		C	-3,9803213*	,9417935	,012	-7,240952	-,719690
	AC	K	14,8283171*	,9417935	,000	11,567686	18,088948
		SN	10,8775197*	,9417935	,000	7,616889	14,138151
		SNC	9,0192969*	,9417935	,000	5,758666	12,279928
		ANC	4,3711659*	,9417935	,005	1,110535	7,631797
		ACC	9,4489317*	,9417935	,000	6,188301	12,709563
	ACC	K	5,3793854*	,9417935	,001	2,118755	8,640016
		AN	-6,4147156*	,9417935	,000	-9,675347	-3,154085
		ANC	-5,0777657*	,9417935	,001	-8,338397	-1,817135
		AC	-9,4489317*	,9417935	,000	-12,709563	-6,188301
C		-9,0580871*	,9417935	,000	-12,318718	-5,797456	
C	K	14,4374725*	,9417935	,000	11,176842	17,698103	
	SN	10,4866751*	,9417935	,000	7,226044	13,747306	
	SNC	8,6284524*	,9417935	,000	5,367821	11,889083	
	ANC	3,9803213*	,9417935	,012	,719690	7,240952	
	ACC	9,0580871*	,9417935	,000	5,797456	12,318718	



Şekil 4.17. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının SOD enzim aktivitesi
 K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik,
 AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik



Şekil 4.18. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının CAT enzim aktivitesi
 K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik,
 AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

Afit varlığında azot kaynaklarının *V.faba* bitkisinde fenolik madde içeriğini ne şekilde etkilediği istatistiki açıdan da değerlendirilerek Çizelge 4.10.' da verilmiştir.

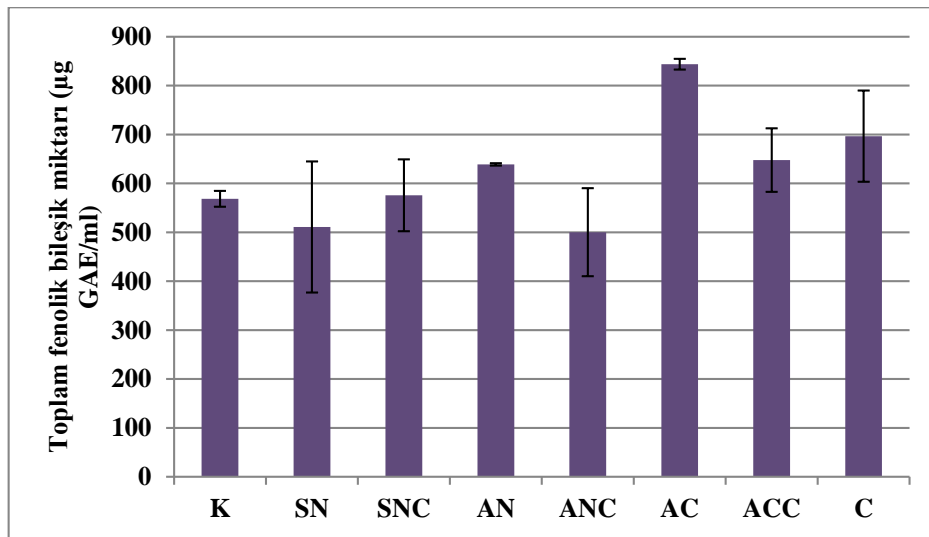
Çizelge 4.10. *V. faba* bitkisinin fenolik bileşik miktarı üzerine farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulamasının etkisinin belirlenmesi (Çoklu Karşılaştırma Analizi, Tukey Post-Hoc testi, $p < 0.05$)

(I) Solüsyon	(J) Solüsyon	Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	Önemlilik (P)	% 95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
K	SN	57,70000	105,81267	,999	-308,6394	424,0394
	SNC	-7,10333	105,81267	1,000	-373,4428	359,2361
	AN	-70,30333	105,81267	,997	-436,6428	296,0361
	ANC	68,36000	105,81267	,997	-297,9794	434,6994
	AC	-275,29667	105,81267	,224	-641,6361	91,0428
	ACC	-79,18667	105,81267	,994	-445,5261	287,1528
	C	-128,08333	105,81267	,917	-494,4228	238,2561
SN	K	-57,70000	105,81267	,999	-424,0394	308,6394
	SNC	-64,80333	105,81267	,998	-431,1428	301,5361
	AN	-128,00333	105,81267	,918	-494,3428	238,3361
	ANC	10,66000	105,81267	1,000	-355,6794	376,9994
	AC	-332,99667	105,81267	,089	-699,3361	33,3428
	ACC	-136,88667	105,81267	,889	-503,2261	229,4528
	C	-185,78333	105,81267	,655	-552,1228	180,5561
SNC	K	7,10333	105,81267	1,000	-359,2361	373,4428
	SN	64,80333	105,81267	,998	-301,5361	431,1428
	AN	-63,20000	105,81267	,998	-429,5394	303,1394
	ANC	75,46333	105,81267	,995	-290,8761	441,8028
	AC	-268,19333	105,81267	,249	-634,5328	98,1461
	ACC	-72,08333	105,81267	,996	-438,4228	294,2561
	C	-120,98000	105,81267	,937	-487,3194	245,3594
AN	K	70,30333	105,81267	,997	-296,0361	436,6428
	SN	128,00333	105,81267	,918	-238,3361	494,3428
	SNC	63,20000	105,81267	,998	-303,1394	429,5394
	ANC	138,66333	105,81267	,882	-227,6761	505,0028
	AC	-204,99333	105,81267	,547	-571,3328	161,3461
	ACC	-8,88333	105,81267	1,000	-375,2228	357,4561
	C	-57,78000	105,81267	,999	-424,1194	308,5594
ANC	K	-68,36000	105,81267	,997	-434,6994	297,9794
	SN	-10,66000	105,81267	1,000	-376,9994	355,6794
	SNC	-75,46333	105,81267	,995	-441,8028	290,8761
	AN	-138,66333	105,81267	,882	-505,0028	227,6761
	AC	-343,65667	105,81267	,074	-709,9961	22,6828
	ACC	-147,54667	105,81267	,847	-513,8861	218,7928
	C	-196,44333	105,81267	,595	-562,7828	169,8961
AC	K	275,29667	105,81267	,224	-91,0428	641,6361
	SN	332,99667	105,81267	,089	-33,3428	699,3361
	SNC	268,19333	105,81267	,249	-98,1461	634,5328
	AN	204,99333	105,81267	,547	-161,3461	571,3328
	ANC	343,65667	105,81267	,074	-22,6828	709,9961
	ACC	196,11000	105,81267	,597	-170,2294	562,4494
	C	147,21333	105,81267	,849	-219,1261	513,5528
ACC	K	79,18667	105,81267	,994	-287,1528	445,5261
	SN	136,88667	105,81267	,889	-229,4528	503,2261
	SNC	72,08333	105,81267	,996	-294,2561	438,4228
	AN	8,88333	105,81267	1,000	-357,4561	375,2228
	ANC	147,54667	105,81267	,847	-218,7928	513,8861
	AC	-196,11000	105,81267	,597	-562,4494	170,2294
	C	-48,89667	105,81267	1,000	-415,2361	317,4428
C	K	128,08333	105,81267	,917	-238,2561	494,4228
	SN	185,78333	105,81267	,655	-180,5561	552,1228
	SNC	120,98000	105,81267	,937	-245,3594	487,3194
	AN	57,78000	105,81267	,999	-308,5594	424,1194
	ANC	196,44333	105,81267	,595	-169,8961	562,7828
	AC	-147,21333	105,81267	,849	-513,5528	219,1261
	ACC	48,89667	105,81267	1,000	-317,4428	415,2361

Fenolik bileşikler bitkilerde pentoz fosfat, şikimik asit ve fenil propanoid yollarında üretilmekte olup, stres koşullarının bitkilerde morfolojik ve fizyolojik önemi olduğu

düşünülen sekonder metabolitlerin üretiminde çok etkili olduğu bulunmuştur. Bu bileşikler patojen ve predatörlere karşı savunmada, büyüme ve üremede oldukça önemli doğal antioksidan bileşiklerdir (Balasundram vd., 2006). Yapılan bir çalışmada stres koşullarında fenolik madde üretiminin fenil alanin üzerinden gerçekleştiren fenil alanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Fenilalanin yapısındaki amino grubunun uzaklaştırılarak serbest radikal grupları tutan –COOH grubuna sahip fenolik bileşiklerin sentezine katkı sağladığı bildirilmiştir (Baque vd., 2010).

Bu çalışmada, bitkiye uygulanan farklı azot kaynağı ve antibiyotik uygulamasının bitkideki fenolik bileşiklerin miktarında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir. Hesaplanan ortalama ve standart hata değerleri kullanılarak oluşturulan grafik verilmiştir (Şekil 4.19). Fenolik bileşik miktarında, kontrol grubu ile kıyaslandığında en fazla artışın sırasıyla AC, C, ACC ve AN uygulaması yapılan bitkilerde olduğu tespit edilmiştir. AC, ACC ve C solüsyonlarının verildiği bitkilerde fenolik madde ile protein değerlerindeki değişiklikler kontrol grubu ile kıyaslandığında aralarında negatif bir korelasyon olduğu görülmüştür ve literatür ile uyumlu bulunmuştur (Li vd., 2008). Bundan dolayı sonuçlara bakıldığında kontrol grubuna göre SNC, AN, AC, ACC ve C uygulama gruplarındaki bitkilerin strese girdiği düşünülmektedir.



Şekil 4.19. *Vicia faba* bitkisi yapraklarının toplam fenolik bileşik miktarı
K:Kontrol, SN: NaNO₃, SNC: NaNO₃+Antibiyotik, AN: NH₄NO₃, ANC: NH₄NO₃+Antibiyotik, AC: NH₄Cl, ACC: NH₄Cl+Antibiyotik, C: Antibiyotik

Farklı azot kaynaklarının etkisinin *Buchnera* varlığını ve afit yapısını ve bitki içeriğinde oluşabilecek bazı değişiklikler tümüyle ele alındığında bu konuda daha fazla çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya konulmuştur. Bu ilişkilerde bitki metabolizmasının göz ardı edilmemesi gerektiği de tespit edilmiştir. Bitkide protein oranının düşmesi, fenolik madde ve antioksidan enzimlerde artışın bulunması, azot kaynaklarının stres yarattığını ortaya koymuştur. Ayrıca afitte morfometrik bozulmanın görülmesi sadece *Buchnera* fonksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği açısından değil, afitin bitkiden aldığı esansiyel amino asitlerin miktarı açısından da değerlendirilmesi zorunluluğunu açığa çıkarmıştır.



BÖLÜM V

SONUÇLAR

Küresel ısınmadaki artışın afidler gibi bitki zararlısı böceklerin olumsuz etkisini daha fazla hissettireceği görüldüğünden bu zararlı ile mücadelede bazı bilinmeyenlerin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Etkili mücadele yürütmek için afidelerin metabolizmasında önemli rol oynayan *Buchnera* gibi zorunlu endosimbiyontların fonksiyonlarının ne olduğu tam olarak belirlenmelidir. Bu çalışmada *A.pisum* afidinde birincil endosimbiyont *Buchnera* varlığına ve dolayısıyla afide etkisi araştırılmıştır. Ayrıca afidin konak bitkisi *V. faba* içeriğine etkisi de incelenmiştir.

5.1 Azot Kaynaklarının *Buchnera*'ya Etkisi

Farklı azot kaynakları ve antibiyotik uygulanan ortamlarda *Buchnera* varlığı moleküler çalışmalar neticesinde tespit edilmiştir. Dolayısıyla *Buchnera*'nın fonksiyonel olarak da incelenmesi gerektiği ve daha ileri çalışmalara örneğin "real time Q" PZR çalışmalarına ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kısa süreli antibiyotik ve azot kaynaklarının denendiği tüm uygulama gruplarında *Buchnera* genomunun varlığı PZR çalışmalarıyla tespit edilmiştir. Ancak tek başına *Buchnera* varlığının ortaya konulması fonksiyonel olduğu anlamına gelmeyeceğinden muhtemel fonksiyonuna ilişkin ilave çalışmalara gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır.

5.2 Azot Kaynaklarının Bitki İçeriğine Etkisi

Bitkiler azot kaynağı olarak toprak ve toprakta azot fikse eden mikrobiyal floradan faydalanırlar. Bu çalışmada kullanılan *Vicia faba* (bakla) bitkisi köklerinde simbiyotik olarak ilişkiye girdiği *Rhizobium* bakterisinin azotu fiksasyonundan da yararlanmaktadır. Bu özelliğinden dolayı nodülleri traşlanan bakla bitkisinin dışarıdan verilen azot kaynaklarına nasıl tepki verdiği bu tez çalışmasında incelenmiştir. Bitkilere aşırı dozda azot kaynakları verildiğinde strese neden olabileceği düşünüldüğünden, bu çalışmada bitki protein ve prolin içeriği, antioksidan aktivitenin ortaya konması açısından katalaz, süper oksit dismutaz enzim aktiviteleri, bitki gelişmesine etkileri açısından fotosentetik pigment içeriğine bakılmıştır. Tüm bu çalışmalar sonucunda

farklı azot kaynaklarının bitkide strese neden olduğu devamında bu durumdan afitlerin olumsuz şekilde etkilendiği tespit edilmiştir.

5.3 Azot Kaynaklarının Afit Morfolojisine Etkisi

Bitki öz suyundan beslenen afitin bitki içeriğinden etkilenecek bazı morfolojik ve fizyolojik değişikliklere uğrayabileceği ve dolayısıyla *Buchnera* fonksiyonunda da farklılıklar görülebileceği kanısına varılmıştır. Çalışma neticesinde azot ve antibiyotik uygulamanın bitkide stres yarattığı ve stres neticesinde afit morfolojisinde bazı değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca stres koşullarının bazı karakterlerde gelişim bozukluklarına yol açtığı belirlenmiştir.

Farklı azot kaynağı içeren solüsyonların ve antibiyotik uygulamalarının afit-konak-endosimbiont ilişkisine etkisi bu çalışmada ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda değişik solüsyon uygulamalarının ve özellikle antibiyotik uygulamalarının afit-konak-endosimbiont ilişkisine etkisi araştırılırken bitki boyutu genellikle ihmal edilmiş, genel yaklaşımla antibiyotiğin endosimbiontları etkisiz hale getirdiği yaklaşımında bulunulmuştur. Çalışmalarda genellikle PZR verileri ve detaylı çalışmalar ortaya konulmadan direkt olarak antibiyotik uygulanınca endosimbiontun ortadan kalktığı ileri sürülmüştür. Oysa bu çalışma *Buchnera* varlığının devamlılığını PZR ile göstermiştir. Bu çalışmanın verilerinin tam olarak desteklenmesi için değişik solüsyon uygulamalarının afitlerde neden olduğu protein içeriği, lipit içeriği, karbonhidrat içeriği gibi bilgilerle beraber değerlendirilmesi gerektiği belirlenmiştir. Afit-konak-endosimbiont ilişkisinin tam olarak ortaya konulması uzun vadede afitlerle biyolojik mücadelede önemli mesafeler alınmasına yol açacağı düşünülmektedir. Son zamanlarda bu alana önemli yönelişlerin olduğu da gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

Akhzari, D. and Pessaraki, M., “Effect of drought stress on total protein, essential oil content, and physiological traits of *Levisticum officinale* Koch”, *Journal of Plant Nutrition*, 39(10), 1365-1371, 2016.

Anonymous, “The international aphid genomics consortium, correction: genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*”, *PLOS Biology*, 16(9), e3000029, 2018.

Awmack, C. S., Harrington, R. and Leather, S. R., “Host plant effects on the performance of the aphid *Aulacorthum solani* (Kalt.) (Homoptera: Aphididae) at ambient and elevated CO₂”, *Global Change Biology*, 3, 545-549, 1997.

Baque, M. A., Lee, E. and Paek, K., “Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: the role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase”, *Plant Cell Reports*, 29(7), 685-694, 2010.

Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S., “Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses”, *Food Chemistry*, 99(1), 191–203, 2006.

Bates, L.S. and Waldern R.P., Teare I.D., “Rapid determination of free proline for water-stress studies”, *Plant and Soil*, 39(1), 205-207, 1973.

Baumann, L. and Baumann, P., “Growth kinetics of the endosymbiont, *Buchnera aphidicola*, in the aphid *Schizaphis graminum*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3440–3443, 1994.

Beauchamp, C. and Fridovich, I., “Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels”, *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287, 1971.

Bel, A.J. E. and Will, T., “Functional evaluation of proteins in watery and gel saliva of aphids”, *Frontiers in Plant Science*, 7, 1840, 2016.

Bergmeyer, N., “Methoden der enzymatischen analyse”, *Akademie Verlag* 1, 636-647, 1970.

Blackman, R.L. and Eastop, V.F., *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs: An Identification and Information Guide*, Vol. 1. & 2, *John Wiley & Sons*, Chichester, England, 2006.

Blackman, R.L. and Eastop, V.F., “Aphids of the world's plants. An online identification and information guide”, <http://www.aphidsonworldsplants.info>, 1 Aralık 2018.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., “Production of plant secondary metabolites: a historical perspective”, *Plant Science*, 161(5), 839-851, 2001.

Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding”, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254, 1976.

Brinza L., Vinuelas, J., Cottret, L., Calevro, F., Rahbe, Y., Febvay, G., Duport, G., Colella, S., Rabatel, A., Gautier, C., Fayard, J., Sagot, M. and Charles, H., “Systemic analysis of the symbiotic function of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*”, *Comptes Rendus Biologies*, 332(11), 1034-1049, 2009.

Brisson, J. A. and Stern, D. A., “The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: an emerging genomic model system for ecological, developmental and evolutionary studies”, *BioEssays*, 28, 747-755, 2006.

Burke, G. R., Normark, B. B., Favret, C. and Moran, N. A., “Evolution and Diversity of Facultative Symbionts from the Aphid Subfamily Lachninae” *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5328-5335, 2009.

Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. and Aras, S., “Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97–110, 2012.

Carolan, J. C., Fitzroy, C. I. J., Ashton, P. D., Douglas, A. E. and Wilkinson, T. L., “The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterised by mass spectrometry”, *Proteomics*, 9(9), 2457–2467, 2009.

Charles, H. and Ishikawa, H., “Physical and genetic map of the genome of *Buchnera*, primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*”, *Journal of Molecular Evolution*, 48(2), 142-150, 1999.

Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V. and Martens, S., “Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1-20, 2013.

Cengiz, F., “Hayvanlarda Zorlanım (Stres) Oluşturan Etkenler”, *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine*, 20, 147-153, 2001.

Coppola, M., Manco, E., Vitiello, A., Di-Lelio, I., Giorgini, M., Rao, R., Pennacchio, F. and Digilio, M. C., “Plant response to feeding aphids promotes aphid dispersal”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(5), 386–394, 2018.

Çördük, N., Akıncı, N., Kaya, N., Yücel, G. and Akı, C., “Effects of dodine on total protein content and peroxidase activity in *Vicia faba* L.”, *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(3), 627-633, 2016.

Dale, C. and Moran, N. A., “Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts”, *Cell*, 126(3), 453–465, 2006.

Dixon, A. F. G., Parthenogenetic reproduction and the rate of increase in aphids, editors Minks, A.K., Harrewijn P., Aphids: their biology, natural enemies and control. World crop pests, volume 2A, *Elsevier*, Amsterdam, Netherlands, 1987.

Dixon, A. F. G., Wellings, P. W., Carter, C. and Nichols, J. F. A., “The role of food quality and competition in shaping the seasonal cycle in the reproductive activity of the sycamore aphid”, *Oecologia*, 95(1), 89-92, 1993.

Dixon, A.F.G., Aphid ecology-An optimization approach, Second Edition, *Chapman & Hall*, London, 1998.

Douglas, A.E., “Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria”, *Journal of Insect Physiology*, 42(3), 247-255, 1996.

Douglas, A.E. and Prosser, W.A., “Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis”, *Journal of Insect Physiology*, 38(8), 565–568, 1992.

Duc, G., “Faba bean (*Vicia faba* L.)”, *Field Crops Research*, 53(1-3), 99-109, 1997.

Dunbar, H.E., Wilson, A. C. C., Ferguson, N. R. and Moran, N.A., “Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts”, *PLOS Biology*, 5(5), 1006-1015, 2007.

Footitt, R. G. and Mackauer, M., “Morphometric variation within and between populations of the pine aphid, *Cinara nigra* (Wilson) (Homoptera: Aphidoidea: Lachnidae), in western North America”, *Canadian Journal of Zoology*, 68(7), 1410-1419, 1990.

Fukatsu, T., Nikoh, N., Kawai R. and Koga, R., “The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera)”, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2748-2758, 2000.

Furch, A. C. U., van Bel, A. J. E. and Will, T., “Aphid salivary proteases are capable of degrading sieve-tube proteins”, *Journal of Experimental Botany*, 66(2), 533-539, 2015.

Gayosa, C., Pomar, F., Merino, F. and Bernal M. A., “Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon”, *Scientia Horticultures*, 102 (1), 1-13, 2004.

Gill, R., Sabater-Munoz, B., Latorre, A., Silva, F. J. and Moya, A., “Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: Toward the minimal genome needed for symbiotic life”, *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 99(7), 4454-4458, 2002.

Golawska, S., Krzyzanowski, R. and Lukasik, I., “Relationship between aphid infestation and chlorophyll content in fabaceae species series botanica”, *Acta biologica Cracoviensia*, 52(2), 76-80, 2011.

Görür, G., “Effects of Heavy metal accumulation in host plants to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) – morphology”, *Ecologia (Bratislava)*, 25(3), 314-321, 2006.

Gulen, H. and Eris, A., “Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants”, *Plant Science*, 166(3), 739–744, 2004.

Güz, N., Dağeri, A. ve Aksoy, S., “Endosimbiyotik bakterilerin böcekler üzerine etkisi”, *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 5(2), 101-113, 2015.

Hardie, J. and Leckstein, P., “Antibiotics, primary symbionts and wing polyphenism in three aphid species”, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(8), 886-890, 2007.

Hare, P. D. and Cress, W.A., “Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants”, *Plant Growth Regulation*, 21(2), 79-102, 1997.

Harrison, K. A., Bol, R. and Bardgett, R. D., “Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes”, *Ecology*, 88(4), 989–999, 2007.

He, Y., Liu, X. and Huang, B., “Changes in protein content, protease activity, and amino acid content associated with heat injury in creeping bentgrass”, *Journal of American Society for Horticultural Science*, 130(6), 842-847, 2005.

Heyworth, E.R. and Ferrari, J., “A facultative endosymbiont in aphids can provide diverse ecological benefits”, *Journal of Evolutionary Biology*, 28(10),1753-1760, 2015.

Humphreys, N. J. and Douglas, A.E., “Partitioning of Symbiotic Bacteria between Generations of an Insect: a Quantitative Study of a *Buchnera* sp. in the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*) Reared at Different Temperatures”, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3294-3296, 1997.

Jander, G., Cui, J., Nhan, B., Pierce, N. E. and Ausubel, F. M., “The TASTY locus on chromosome 1 of *Arabidopsis* affects feeding of the insect herbivore *Trichoplusia*”, *Plant Physiology*, 126: 890–898, 2001.

Jaouannet, M., Rodriguez P. A., Thorpe, P., Lenoir, C. J. G., MacLeod, R., Escudera-Martinez, C. and Bos, J. I. B., “Plant immunity in plant–aphid interactions”, *Frontiers in Plant Science*, 5, 663, 2014.

Jousselin, E., Clamens, A. L., Galan, M., Bernard M., Maman, S., Gschloessl, B., Duport, G., Meseguer, A. S., Calevro, F. and Coeur d’acier, A., “Assessment of a 16S rRNA amplicon Illumina sequencing procedure for studying the microbiome of a symbiont-rich aphid genus”, *Molecular Ecology Resources*, 16(3), 628-640, 2016.

Kacar, B., Katkat, V. ve Öztürk, Ş., Bitki Fizyolojisi, *Nobel*, İstanbul, 2002.

Khan, M. A. M., Ulrichs, C. and Mewis I., “Influence of water stress on the glucosinolate profile of *Brassica oleracea* var. *italica* and the performance of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 137(3), 229–236, 2010.

Khan, M. H. and Yoldaş, Z., “Assessment of the functional response parameters of *Coccinella septempunctata* to varying densities of *Acyrtosiphon pisum*”, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(4), 1165–1170, 2018.

Kim J. H., Lee B. W., Schroeder, F. C. and Jander, G., “Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid)”, *The Plant Journal*, 54(6), 1015–1026, 2008.

Koç, E. ve Üstün, A. S., “Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(1-2), 82-100, 2008.

Koga, R., Tsuchida, T. and Fukatsu, T., “Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid”, *Proceedings of The Royal Society*, 270(1533), 2543-2550, 2003.

Koskinioti, P., Ras, E., Augustinos, A. A., Tsiamis, G., Beukeboom, L. W., Caceres, C. and Bourtzis, K., “The effects of geographic origin and antibiotic treatment on the gut symbiotic communities of *Bactrocera oleae* populations”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(3), 197–208, 2019.

Landau, S. and Everitt, B. S., A handbook of statistical analyses using SPSS, *Chapman & Hall*, Boca Raton, London, Newyork, Washigton D. C., 2004.

Li, J., Zhu, Z. and Gerendas, J., "Effects of nitrogen and sulfur on total phenolics and antioxidant activity in two genotypes of leaf mustard", *Journal of Plant Nutrition*, 31(9), 1642-1655, 2008.

Liaoa, X., Zou, R., Li, B., Tong, T., Xie, S. and Yuan, B., “Biodegradation of chlortetracycline by acclimated microbiota”, *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 11-17, 2017.

Lv, N., Wang, L., Sang, W., Liu, C. Z. and Qiu, B. L., “Effects of endosymbiont disruption on the nutritional dynamics of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*”, *Insects*, 9, 161, 1-11, 2018.

Ma, R., Reese, J. C., Black, W. C. and Bramel-Cox, P. “Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae)”, *Journal of Insect Physiology*, 36(7), 507-512, 1990.

Machado-Assefh, C.R., Lopez-Isasmendi, G., Tjallingii, W.F., Jander, G. and Alvarez, A.E., “Disrupting *Buchnera aphidicola*, the Endosymbiotic bacteria of *Myzus persicae*, delays host plant acceptance”, *Arthropod-Plant Interactions*, 9(5), 529-541, 2015.

Madhusudhan, V. V. and Miles, P. W. “Mobility of salivary components as a possible reason for differences in the responses of alfalfa to the spotted alfalfa aphid and pea aphid”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86(1), 25–39, 1998.

Martin, J. H., “ The Identification of common aphid pests of tropical agriculture”, *Tropical Pest Management*, 29(4), 395-411, 1983.

Martinez-Torres, D., Buades, C., Latorre A. and Moya, A., “Molecular Systematics of Aphids and Their Primary Endosymbionts”, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(3), 437-449, 2001.

Mdellel, L. and Kamel, M. B. H., “Impact of ecological zones on morphology of *Pterochloroides persicae* Cholodkovsky (Hemiptera, Aphididae)”, *Journal of Entomological Research*, 3(1), 15-21, 2015.

Mdellel, L., Adouani, R. and Kamel, M. B. H., “Influence of compost fertilization on the biology and morphology of green peach aphid (*Myzus persicae*) on pepper”, *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 7(3), 48-54, 2019.

Mehrpour, M., Madjdzadeh, S. M., Mahdavi Arab, N., Esmaeilbeygi, M. and Ebrahimpour, E., “Morphometric discrimination of Black Legume Aphid, *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae), populations associated with different host plants”, *North-Western Journal of Zoology*, 8(1), 172-180, 2012.

Morgan, D., Walters K. F. A. and Aegerter, J. N., “Effect of temperature and cultivar on pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) life history”, *Bulletin of Entomological Research*, 91(1), 47-52, 2001.

Montllor, C. B., Maxmen, A. and Purcell, A. H., “Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress”, *Ecological Entimology*, 27(2), 189-195, 2002.

Moran, N. A., Degnan, P. H., Santos, S. R., H.E. Dunbar, H. E. and H. Ochman, H., “The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(47), 16919-16926, 2005.

Munson, M. A., Baumann, P. and Kinsey, M. G., “*Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a Taxon Consisting of the Mycetocyte- Associated, Primary Endosymbionts of Aphids”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(4), 566-568, 1991.

Mugford, S. T., Barclay, E., Drurey, C., Findlay, K.C. and Hogenhout, S. A., “An immuno-suppressive aphid saliva protein is delivered into the cytosol of plant mesophyll cells during feeding”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(11), 854–861, 2016.

Müller, C. B., Williams, I. S. and Hardie, J., “The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids”, *Ecological Entomology*, 26(3), 330-340, 2001.

Nakabachi, A. and Ishikawa, H., “Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*”, *Journal of Insect Physiology*, 45(1), 1-6, 1999.

Norshazila, S., Othman, R., Jaswir, I. and Yumi-Zuhanis, H.H., “Effect of abiotic stress on carotenoids accumulation in pumpkin plants under light and dark conditions”, *International Food Research Journal*, 24, 387-394, 2017.

Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R. and Moran, N. A., “Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits”, *Annual Review of Entomology*, 55, 247–266, 2010.

Ohtaka, C. and Ishikawa, H., “Effects of heat treatment on the symbiotic system of an aphid mycetocyte”, *Symbiosis*, 11, 19-30, 1991.

Pontes, M. H. and Dale, C., “Culture and manipulation of insect facultative symbionts”, *Trends in Microbiology*, 14(9), 406–412, 2006.

Russell, J. A., Latorre, A., Sabater-Munoz, B., A. Moya and N.A. Moran, N. A., “Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the *Aphidoidea*”, *Molecular Ecology*, 12(4), 1061-1075, 2003.

Russell, J. A. and Moran, N. A., “Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures”, *Proceedings of the Royal Society B*, 273(1586), 603–610, 2005.

Sasaki, T. and Ishikawa, H., “Production of Essential Amino Acids from Glutamate by Mycetocyte Symbionts of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*”, *Journal of Insect Physiology*, 41(1),41-46, 1995.

Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. and Ishikawa, H., “Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS”, *Nature*, 407(6800), 81–86, 2000.

Skaljac, M., *Biology and Ecology of Aphids*, Editor Andreas Vilcinskas, *CRC Press*, Germany, 2016.

Singleton, V .L. and Rossi, J. A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158, 1965.

Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. M., “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent”, *Methods in Enzymology*, 299, 152–178, 1999.

Smith, C. M. and Chuang, W. P., “Plant resistance to aphid feeding: behavioral, physiological, genetic and molecular cues regulate aphid host selection and feeding”, *Pest Management Science*, 70(4), 528-540, 2014.

Soares, A. R., Marchiosi, R., Siqueira-Soares, R. C., Lima, R. B., Santos, W. D. and Ferrarese-Filho, O., “The role of L-DOPA in plants”, *Plant Signaling and Behavior*, 9(4), 1-7, 2014.

Strzalka, K., Kostecka-Gugala, A. and Latowski, D., “Carotenoids and environmental stress in plants: significance of carotenoid-mediated modulation of membrane physical properties”, *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(2), 168–173, 2003.

Sytykiewicz, H., “Differential expression of superoxide dismutase genes in aphid-stressed maize (*Zea mays* L.) seedlings”, *PLOS ONE*, 9(4), 1-12, 2014.

Thorpe, P., Cock, P. J. A. and Bos, J., “Comparative transcriptomics and proteomics of three different aphid species identifies core and diverse effector sets”, *BMC Genomics*, 17, 1-18, 2016.

Tsuchida T., Koga R., Shibao, H., Matsumoto, T. and Fukatsu, T., “Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*”, *Molecular Ecology*, 11(10), 2123–2135, 2002.

Tsuchida, T., R. Koga, Meng, X. Y., Matsumoto, T. and Fukatsu, T., “Characterization of a facultative endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*”, *Microbial Ecology*, 49(1), 126-133, 2005.

Tsuchida, T., Koga, R., Matsumoto, S. and Fukatsu, T., “Interspecific symbiont transfection confers a novel ecological trait to the recipient insect”, *Biology Letters*, 7(2), 245–248, 2011.

Tukey, J.W., “Some selected quick and easy methods of statistical analysis”, *Trans. of New York Acad. Sci.* 1, 88-97, 1954.

Wang, J., Chung, S.H., Peiffer, M., Rosa, C., Hoover, K., Zeng, R. and Felton, G. W., “Herbivore oral secreted bacteria trigger distinct defense responses in preferred and non-preferred host plants”, *Journal of Chemical Ecology*, 42(6), 463–474, 2016.

Wearing, C.H., “Responses of *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae* to leaf age and water stress in Brussels sprouts grown in pots”, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 15(1), 61–80, 1972.

Wilkinson, T.L. and Douglas, A. E., “Aphid feeding, as influenced by disruption of the symbiotic bacteria: an analysis of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*)”, *Journal of Insect Physiology*, 41(8), 635-640, 1995a.

Wilkinson, T.L. and Douglas, A.E., “Why pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria have elevated levels of the amino acid glutamine”, *Journal of Insect Physiology*, 41(11), 921-927, 1995b.

Wilkinson, T.L., “The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 119(4), 871-881, 1998.

Wink, M., “Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores”, *Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), 225–233, 1988.

Witham, F.H., Blayles, D.F. and Devlin, R.M., “Experiments in plant physiology” , *Van Nostrand Reinheld Company*, New York, 1971.

Yao, I., “Seasonal changes in the density of the symbionts *Buchnera* and *Wolbachia* of the aphid *Tuberculatus macrotuberculatus* on *Quercus dentata*”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(3), 261–268, 2019.

Zhang, F., Li, X., Zhang, Y., Coates, B., Zhou, X.J. and Cheng D., “Bacterial symbionts, *Buchnera*, and starvation on wing dimorphism in English grain aphid, *Sitobion avenae* (F.) (Homoptera:Aphididae)”, *Frontiers in Physiology*, 6(155), 1-9, 2015.



Ek-A (Devam) Morfometrik Ölçümler

ÖLÇÜLEN DEĞERLER (19)																				
SOL (8)											SAĞ (8)									
19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
L. HT1	L. HT3	L. ANT	L. PT/	L. A6B	L. A6P	L. AIII	L. SIP	R. HT1	R. HT3	R. ANT	R. PT/	R. A6	R. A6P	R. ANT	R. SIP	R. UR5	CAU	BL	ÖRN.	
																			NO	
																			PRE.	
																			NO	
																			GRUP	
																			NO	
							1								1	0,1	0,7	2,5	1	
	2,6					1	0,8	0,2	2,6	4,25	3,8	0,3	1,1	1	0,8	0,1	0,5	2		
0,2	2,6	4,3	4,4	0,3	1,2	1	0,9	0,2	1,9	4,24	4,6	0,3	1,2	1	0,9	0,1	2,5	3		
0,2	2,9			0,3		1,1	1,2	0,2	3						1,2	0,1	0,6	4		
		3,9	4,4	0,3	1,2	0,7	0,8					0,3		0,7	0,9	0,1	0,4	1		
0,2	2,9			0,3		1,1	1	0,2	2,9			0,3		1,2	1	0,1	0,6	2		
0,2	1,9	3,3	4,5	0,2	1	0,6	0,8	0,2	2	3,38	3,92	0,3	1	0,6	0,8	0,1		1		
0,2	2,5	4,2	4,1	0,3	1,1	1	0,9	0,2	2,5	4,65	5,5	0,3	1,6	1	0,9	0,1	0,5	2		
0,2	2,1						0,8	0,2	2	3,42	4,5	0,2	1	0,6	0,8	0,1	0,5	3		
	2,7						1	0,2	2,7							0,1	0,6	2,7	4	
	2,8	4,5	4,4	0,3	1,2	1		2,7	4,58	4,4	0,3	1,2	1	1		0,1	0,6	3,5	5	
	2,8						0,9									0,1	0,7	2,7	1	
							0,9									0,1	0,7	2,4	2	
	2,6	3,9	4,1	0,3	1,1	0,8	0,3							0,9	0,3	0,1	0,5	2,3	3	
	2,6						0,9								0,9	0,1	0,6	2,6	1	
0,2	3,1			0,3		1,2	1,2	0,2	3					1,2	1,1	0,1	0,7	2,4	1	
0,2	3,1			0,3		1,2	1,2	3,1				0,3		1,2	1,2	0,1	0,8	2,8	2	
0,2	3	5	4,1	0,3	1,3	1,2	1	0,2	3,1			0,3		1,2	1	0,1	0,7	2,8	3	
0,2	3			0,3		1,2	1,1					0,3		1,2	1,1	0,1	0,5	2,8	4	
	3,3						1,3	0,2	3,3						1,3	0,1	0,7	3,5	5	
0,2	2,9			0,3		1,1	1	0,2	2,9	4,6	3,8	0,3	1,2	1,1	1,1	0,1	0,6		6	

Ek-A (Devam) Morfometrik Ölçümler

ÖLÇÜLEN DEĞERLER (19)																		
SOL (8)																		
19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
L. HT1	L. HT3	L. ANT	L. PT/	L. A6B	L. A6P	L. AIII	L. SIP	R. HT1	R. HT3	R. ANT	R. PT/	R. R.A6	R. R. A6P	R. ANT	R. SIP	R. UR	CAU	BL
HT3	HT3	ANT	PT/	A6B	A6P	AIII	SIP	HT1	HT3	ANT	PT/	R.A6	R. A6P	ANT	SIP	URS	DA	
		T	Base	ase	T			T		T	Base	Base	T	III	V			
SAĞ (8)																		
ÖRN.	PRE.	SOL.	GRUP															
NO	NO	(AMONYUM NİTRAT+KLRTSKLN)	NO															
			3															
	1																	
1	3																	
2	2																	
3	3																	
4	4																	
5	5																	
6	6																	
7	7																	
8	8																	
9	9																	
10	10																	
11	11																	
12	12																	
13	13																	
14	14																	
15	15																	
16	16																	
17	17																	
18	18																	
19	19																	

Ek-A (Devam) Morfometrik Ölçümler

ÖLÇÜLEN DEĞERLER (19)																					
SOL (8)											SAĞ (8)										
L. HT1	L. HT3	L. ANT	L. PT/ Base	L. A6B	L. A6P	L. AIII	L. SIP	R. HT1	R. HT3	R. ANT	R. PT/ Base	R. A6P	R. A6T	R. ANT	R. III	R. SIP	R. IV+	URS	CAU	BL	
								2,7								1	0,1	0,6	2,9	1	
							0,9	2,6								0,9	0,1	0,5	2		
0,2	2,9						0,8	2,8								0,8	0,1	0,6	3		
0,2	2,8						1,1	2,8									0,1	0,6	2,6	4	
0,2	2,5	4,5	4,3	0,3	1,2	1	1,1		4,6	4	0,3	1,2	1	1,1	1	1,1	0,1	0,5	4,2	1	
							1,1										0,1	0,6	2,9	2	
0,2	2,6			0,3		1	0,8	0,2	2,6		0,3			1			0,1	0,4	2,3	1	
0,2	2,6			0,3		1	0,8	0,2	2,5	4,5	4,1	0,3	1,2	1	0,8	0,1				2	
				0,3		1,1	1	0,2	2,8		0,3			1,1	1	0,1		0,6		3	
0,2	3			0,3		1,2	1,1	0,2	3,1	5	4	0,3	1,3	1,2	1,1	0,1	0,1	0,7	2,8	1	
0,2	3,2			0,3		1,2	1,3	0,2	3,3		0,3			1,2	1,3			0,8	3,7	2	
0,2	2,8			0,3		1,2	1	0,2	2,8		0,3			1,2	1,2	0,1	0,1	0,9	2,4	3	
				0,3		1,1	1,3	0,2	3,1	5,2	4	0,3	1,4	1,2	1,2	0,1	0,1	0,8		4	
0,2	2,8	4,7	4,1	0,3	1,2	1	1	0,2	2,7	4,6	3,9	0,3	1,2	1	1	0,1	0,1	0,5	2	5	
							1,1									1	0,1	0,7	3	6	
				0,3		1	1	2,9						1	1	0,1	0,1	0,6	2,5	7	
0,2	2			0,3		0,6	0,8	0,2	2	3,5	4,2	0,3	1	0,6	0,8	0,1	0,1	0,4	2,1	8	
		4,8	3,2	0,3	1,1	1,1	1,2		4,8	3,6	0,3	1,1	1,2	1,3	0,1	0,1	0,1	0,7	3,6	1	
0,2	2,6	4,2	2,2	0,4	0,8	1	1	0,2	2,7		0,3			1	1	0,1	0,1	0,6	2,6	2	
0,2	3					0,9	1,2		4,8	4	0,3	1,2	1,2	1,1	1,2	0,1	0,1	0,9	3,4	3	
	3,1			0,3		1,1	1,3				0,3			1,2	1,3	0,1	0,1	0,7	3,6	4	
	2,7	4,6	3,9	0,3	1,2	1,1	0,8	0,2	2,6	4,6	4,1	0,3	1,2	1,1	0,9	0,1	0,1	0,5	2,2	5	
0,2	3,1	5	4	0,3	1,2	1,1	1,2	0,2	3,1	5	3,7	0,3	1,2	1,1	0,1	0,1	0,1	0,7	3,6	6	
																				7	
AC (AMONYUM KLORÜR)																					
4																					

Ek-A (Devam) Morfometrik Ölçümler

ÖLÇÜLEN DEĞERLER (19)																						
SOL (8)											SAĞ (8)											
L. HT1	L. HT3	L. ANT T	L. PT/ Base	L. A6B ase	L. A6P T	L. A6P T	L. A6P T	L. A6P T	L. A6P T	L. A6P T	R. HT1	R. HT3	R. ANT T	R. PT/ Base	R. A6P T	R. A6P T	R. A6P T	R. A6P T	R. SIP	URS IV+ V	CAU DA	BL
0,2	2,6	4,3	3,8	0,3	1,1	0,8							4,3	4,1	0,3	1,1	1	0,8	0,1	0,7	2,5	1
						0,3	0,2	2,4	3,7	3,2	0,3	0,9	0,9	0,3	0,1	0,5	2,8	2				
0,2	2,6					0,7	0,2	2,6										0,7	0,1	0,6	3	3
0,2	2,3	4,3	4,8	0,3	1,2	1	0,4	2,6	4,4	4,8	0,3	1,2	1	1	0,1	0,7	3	4				
						1,1			4,5	4,6	0,3	1,2	1		0,1	0,6	2,9	5				
0,2	1,9	4,4	3,8	0,3	1,1	1	0,9	2,1							0,9	0,1	0,8	2	6			
0,2	2,6					0,9									0,9	0,1	2,8	1				
0,2	1,8					0,6	0,2	1,8							0,7	0,1		2				
						0,9	0,2	2,4							0,9	0,1	2,4	3				
0,2	3			0,3		1,2	0,2	3,1	5	4,7	0,3	1,3	1,2	1,2	1,2	0,1	0,7	1				
		4,8	3,5	0,3	1,1	1,1	1		4,8	3,6	0,3	1,1	1,1	1	1	0,1	0,6	3	2			
0,2	3	5,2	3,9	0,4	1,4	1,3	1,2	0,2	3	5,2	3,9	0,4	1,4	1,2	1,2	0,1	0,7	3	3			
0,2	2,8	5	4,3	0,3	1,3	1,1	1,1	0,2	2,9	5	4,5	0,3	1,4	1,2	1,1	0,1	0,7	3,4	4			
0,2	2,4	4,5	3,8	0,3	1,2	1	0,9	2,4	4,6	3,8	0,3	1,2	1	0,9	0,1	0,5	3,2	5				
		4,5	3,9	0,3	1,2	1	1,1		4,6	4	0,3	1,2	1	1	0,1	0,6		1				
0,2	3,3			0,3		1,1	0,2	3,1			0,3			1,1	1	0,7	3,5	2				
0,2	3,2	5,2	4	0,3	1,3	1,3	0,2	3	5,1	3,5	0,3	1,2	1,3	1,2	0,1	0,6	2,9	3				
		4,8	3,9	0,3	1,2	1,1	1	0,2	4,8	3,9	0,3	1,2	1,1	1,1	0,1	0,7	3,7	4				
0,2	3,3			0,4		1,3	0,2	3,2	5,4	4,4	0,3	1,4	1,3	1,2	0,7			5				
0,2	2,8	5	4,3	0,3	1,3	1,2	1,1	0,2	5	4,5	0,3	1,4	1,2	1,1	0,1	0,6	3,4	1				
0,2	3,2	5,2	4	0,3	1,3	1,2	1,3	0,2	3	5,1	3,6	0,3	1,2	1,2	0,1	0,6	2,9	2				
0,2	2,5			0,3		0,9	0,2	2,4			0,3			1,1	1	0,5	2,4	3				

Ek-A (Devam) Morfometrik Ölçümler

ÖLÇÜLEN DEĞERLER (19)																				
SOL (8)											SAĞ (8)									
19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
L. HT1	L. HT3	L. ANT	L. PT/	L. A6B	L. A6P	L. AIII	L. SIP	R. HT1	R. HT3	R. ANT	R. PT/	R. A6	R. A6P	R. ANT	R. SIP	R. IV+	CAU	BL	GRUP	
			Base	ase	T			T	T	Base	Base	T	T	III	ANT	V	DA		NO	
0,2	2,8	4,3	4,8	0,2	1,1	1	1,2	0,2	2,8						1,1	0,1	0,6	2,9	1	
		4,1	4,2	0,3	1	1	0,2	1,8							1,2	0,1	0,6		2	
0,2	2,5	4,1	4,4	0,3	1,1	0,9	1	0,2	2,6	4,16	4,4	0,3	1,1	1	1	0,1	0,7	2,8	4	
0,1	2,6	4,1	4,2	0,3	1,1	1	1								1,1		0,5	2,8	5	
0,2	1,7	2,9	5,3	0,2	1,1	0,6	0,7	0,2	1,7	2,92	4	0,2	0,8	0,6	0,7	0,1	0,3	1,8	6	
								0,2	2,7						1,2	0,1	0,7	3	7	
0,2	2,9						1,3	0,2	2,9						1,2	0,1	0,8	2,9	1	
0,2	2,6							0,2	2,6	4,22	4,2	0,3	1,1	1		0,1	0,5	2,3	2	
0,2	1,7	3	4,2	0,2	0,9	0,6	0,8	0,2	1,7	2,98	4,7	0,2	0,9	0,6	0,8	0,1		2,6	3	
	2,6	4,1	4	0,3	1,1	1	1,1	0,2	2,5			0,3		1	1,1	0,1	0,6	2,6	1	
																0,1	0,6	2,4	2	
0,2	2,8			0,3		1	1	0,2	2,8	4,61	3,1	0,3	1	1,1	1	0,1	0,5	2,3	1	
0,2	2	3,7	4,8	0,3	1,2	0,6	0,8	0,2		3,8	4,2	0,3	1,2	0,7	0,8	0,1			2	
		3,5	4,2	0,3	1,1	0,6	0,6			3,54	4,1	0,3	1,1	0,6	0,7	0,1		2,4	3	
0,2	2,7	4,6	3,9	0,3	1,2	1		0,2	2,7	4,37	4	0,3	1,2	1	1	0,1		2,5	4	
							0,9								0,9	0,1	0,6		5	
0,2	2,9	4,8	4	0,3	1,2	1,1	1,1	0,2	2,9			0,3		1,1	1,1	0,1	0,6	3,1	6	
0,2	2,5	4,1	4,4	0,3	1,1	0,9	1	0,2	2,6	4,16	4,4	0,3	1,1	1	1	0,1	0,7	2,8	1	
0,1	2,6	4,1	4,2	0,3	1,1	1	1								1,1	0,1	0,5	2,8	2	
0,2	1,7	2,9	5,3	0,2	1,1	0,6	0,7	0,2	1,7	2,92	4	0,2	0,8	0,6	0,7	0,1	0,3	1,8	3	
0,2	2,6	2,6	3,9	0,3	1	1		0,2	2,6	2,6	3,6	0,3	0,9	1	1,2	0,1	0,7	2,9	4	

Ek-A (Devam) Morfometrik Ölçümler

ÖLÇÜLEN DEĞERLER (19)																		
SOL (8)																		
19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
L. HT1	L. HT3	L. ANT	L. PT/ Base	L. A6B	L. A6P	L. AIII	L. SIP	R. HT1	R. HT3	R. ANT	R. PT/ Base	R. A6	R. A6P	R. ANT	R. SIP	R. IV+	CAU	BL
2,7	2,7	4,1	3,7	0,3	1	1	0,9	0,2	2,7						0,9	0,1	0,7	2,9
							0,9	0,2	1,9	4,3	4,4	0,3	1,2	1	0,9	0,1	0,6	
2,7						1,1	1	0,2	2,7						1	0,1	0,6	2,1
0,2	2,7						0,9		1,5						0,7	0,1	0,7	2,5
							0,9		2,7						0,9	0,1	0,6	2,5
0,1	2,5					0,9	0,8		2,5						0,8	0,1	0,6	2,4
							0,9	0,2	2,8						0,9	0,1	0,7	2,7
0,2	2,8						0,9								0,9	0,1	0,7	2,6
0,2	2,4						0,8	0,2	2,5						0,8	0,1	0,6	2,7
				0,3		1,1	1,1	0,2	2,8			0,3		1,1	1	0,1	0,7	2,8
0,2	2,3						0,8	0,2	2,4						0,8	0,1	0,5	2,4
						1,1	1	0,2	2,9							0,1	0,8	
							1		2,8						1	0,1	0,5	
	2,5					1		0,1	2,1						0,8	0,1	0,7	2,8
							0,9		2,7						0,9	0,1	0,8	2,9
0,2	1,9	3,4	3,6	0,3	1,1	0,6	0,7	0,2	2	3,5	4,5	0,2	1	0,6	0,8	0,1		2,1
0,2	3						1	0,2	3	5	4,1	0,3	1,3	1,1	1	0,1	0,6	2,9
0,2	2,7	4,6	4,4	0,3	1,2	1,1	0,8	0,2	2,6	4,6	4	0,3	1,2	1,1	0,9	0,1		
0,2	1,9	3,4	3,6	0,3	1,1	0,6	0,7	0,2	2	3,5	4,5	0,2	1	0,6	0,8	0,1	0,7	2,1
0,2	3						1	0,2	3	5	4,1	0,3	1,3	1,1	1	0,1	0,6	2,9
0,2	2,4	5	4,2	0,3	1,3	1,2	0,8	0,2	2,5	5	4,3	0,3	1,3	1,2	0,8	0,1	0,6	2,7
	2,7	4,9	4,0	0,3	1,3	1,1	1,1	0,2	2,7			0,3		1,1	1	0,1	0,7	2,8
C (KLORTETRASİKİLN)																		
8																		

ÖZ GEÇMİŞ

Gülay Olcabey Ergin 29.10.1986 tarihinde Niğde’de doğdu. İlk, orta ve lise öğretimini Niğde’de tamamladı. 2005 yılında girdiği Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden Haziran 2009’ da mezun oldu. 2009 yılında Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Temmuz 2012’de yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2013 yılında doktora eğitimine başladı. Bilim dalındaki ilgi alanı biyoteknoloji, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji ve entomolojidir.



TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER

Bu tez çalışmasından, 1(bir) adet ulusal ve 1(bir) adet uluslararası bildiri üretilmiştir. Bu üretilen çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Olcabey Ergin, G., Öztürk, A. ve Görür, G., “Antibiyotik kullanımının *Vicia Faba* (bakla) bitkisinin gelişmesi üzerine etkisi”, **23. Ulusal Biyoloji Kongresi**, Gaziantep, s. 51, 5-9 Eylül, 2016.

Olcabey Ergin, G., Görür, G. and Öztürk, A., “Different Approaches to Aphid-Endosimbiyont-Host Plant Relationship”, **10th International Symposium on Aphids**, Cappadocia, Turkey, s. 15, 4-8 September, 2017.

