



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜTÜN BİTKİSİNDE HARPİN İLE İNDÜKLENEN
BİYOTİK STRESİN GAMA AMİNOBÜTİRİK ASİT
(GABA) YOLUYLA İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Gizem DİMLİOĞLU

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Melike BOR

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunuş Tarihi : 25.07.2014

E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bornova-İZMİR

2014

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TÜTÜN BİTKİSİNDE HARPİN İLE İNDÜKLENEN
BİYOTİK STRESİN GAMA AMİNOBÜTİRİK ASİT
(GABA) YOLUYLA İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Gizem DİMLİOĞLU

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Melike BOR

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunuş Tarihi : 25.07.2014

Bornova-İZMİR

2014

Gizem DİMLİOĞLU tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Tütün Bitkisinde Harpin İle İndüklenen Biyotik Stresin Gama Aminobütirik Asit (GABA) Yoluyla İlişkisinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 25.07.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Doç. Dr. Melike BOR
Raportör Üye	: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR
Üye	: Doç. Dr. Okan ACAR

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Tütün Bitkisinde Harpin İle İndüklenen Biyotik Stresin Gama Aminobütirik Asit (GABA) Yoluyla İlişkisinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

25 / 07 / 2014

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET**TÜTÜN BİTKİSİNDE HARPİN İLE İNDÜKLENEN BİYOTİK STRESİN GAMA AMİNOBÜTİRİK ASİT (GABA) YOLUYLA İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

DİMLİOĞLU, Gizem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Melike BOR

Temmuz 2014, 56 sayfa

Bitkiler, funguslar, virüsler ve böcekler gibi biyotik stres faktörlerine sürekli olarak maruz kalmaktadırlar (Thordal-Christensen, 2003). Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen harpin proteini çeşitli bitki türlerinde savunma yanıtlarını aktif hale getirmektedir (Wei et al., 1992). Harpin ile indüklenen gen ifadesinin bitkide; hücrel iletişiminde, sinyal iletiminde ve savunma yanıtlarında yer aldığını göstermektedir (Livaja et al. 2008). Gamma aminobütirik asit (GABA), protein yapısına katılmayan dört karbonlu bir aminoasittir. Bitkilerde azot depolanmasında, pH düzenlenmesinde, bitki gelişim ve savunmasında, ozmotik düzenleyici ve sinyal molekülü olarak çeşitli görevlere sahiptir (Shelp et al., 1999). Çeşitli bitkilerde soğuk, kuraklık, tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarında GABA seviyesindeki değişimler incelenmiştir (Kinnersley and Trurano, 2000) ancak biyotik stres koşullarındaki düzeyleri çok iyi bilinmemektedir.

Bu çalışmada Tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisinde biyotik stres ile GABA metabolizması ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, tütün bitkilerinde 1µM harpin ile indüklenen biyotik stres koşullarında, GABA ve Glutamat miktarındaki değişimler, Glutamat Dekarboksilaz (GAD) ve Glutamat Dehidrogenaz (GDH) enzimlerinin aktivite değişimleri, Hidrojen Peroksit (H₂O₂) miktarındaki değişimler ve çeşitli fizyolojik parametreler incelendi. Glutamat, GABA ve enzim aktivitelerinde stres grubunda farklı düzeyler belirlendi. Tütün bitkisinde harpin ile indüklenen biyotik stresin GABA metabolizmasını abiyotik strese göre daha hızlı etkilediği gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: GABA, *Nicotiana Tabacum*, Biyotik Stres.

ABSTRACT**DETERMINATION OF THE RELATION BETWEEN HARPIN
INDUCED BIOTIC STRESS AND GAMMA AMINO BUTYRIC ACID
(GABA) SHUNT IN TOBACCO PLANT**

DIMLIOGLU, Gizem

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Melike BOR

July 2014, 56 pages

Plants are continuously exposed to biotic stress factors such as fungi, viruses and herbivores (Thordal-Christensen, 2003). Harpin proteins produced by gram-negative phytopathogens in order to activate defense responses in various plant species (Wei et al., 1992). In plants harpin triggers genes' expression which are involved in signal transduction, cellular communication and defense responses (Livaja et al. 2008). Gamma-amino butyric acid (GABA) is a four-carbon non-protein amino acid. GABA have roles in nitrogen storage, pH regulation, plant development and defense, also as compatible osmolyte and signal molecule (Shelp et al., 1999). The accumulation of GABA is increased by the effect of abiotic stresses such as drought, salt, cold in diverse plant species however, information about the accumulation of GABA under biotic stress conditions remained to be unclear.

The aim of this study was to determine the effect of biotic stress which is induced by harpin on GABA metabolism in *Nicotiana tabacum* plants. GABA and glutamate contents, activities of Glutamate dehydrogenase (GDH) and Glutamate decarboxylase (GAD) enzymes, H₂O₂ contents and physiological parameters were measured in order to evaluate the effect of biotic stress induced by 1µM harpin in tobacco plant. Differences on GABA, glutamate and enzyme activity levels were detected and harpin induced biotic stress affected GABA metabolisms more rapidly as compared to that of abiotic stressors in tobacco plants.

Keywords: GABA, *Nicotiana tabacum*, Biotic Stress.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, beni her konuda cesaretlendiren, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim Değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Melike BOR'a, tez çalışmam boyunca engin bilgi birikimi ve fikirleri ile çalışmalarımı yön veren, manevi açıdan yanımda olduğunu hissettiğim Sayın Hocam Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım ve ders dönemimde değerli bilgilerini esirgemeyen ve benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. İsmail TÜRKAN ve Doç. Dr. Hediye SEKMEN ESEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yanımda olan arkadaşlarım Araş. Gör. Süleyman İLHAN'a, Tuğba KARABUDAK'a ve Alpay PELVAN'a, üniversiteye başladığım ilk seneden beri beni hiç yalnız bırakmayan sevgisini her zaman hissettiğim canım arkadaşım Zeycan AKCAN DAŞ'a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her an yanımda olan, verdiğim kararların arkasında duran, beni her yönden destekleyen, bana sonsuz sevgi veren ve varlıkları ile her zaman mutluluk duyduğum annem Şükriye DİMLİOĞLU'na, babam Kenan DİMLİOĞLU'na ve ağabeyim Kaan DİMLİOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Okul hayatım dışında desteklerini hep hissettiğim kuzenim Tuğçe AŞÇI'ya, arkadaşlarım Özlem KOLAY ve Eda YAŞAR'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyotik Stres	2
1.1.1 Virulans faktörleri ve efektörler	3
1.2 Harpin	3
1.3 Bitki İmmün Sistemi	5
1.3.1 Hücre içi ve hücre dışı efektör tanıma	5
1.3.2 Bakteriyal ve ökaryotik efektör fonksiyonları	5
1.3.3 NB-LRR aktivasyonu	6
1.4 Bitki Savunmasında Yer Alan Sinyal Yolakları	7
1.4.1 Bitki direnç proteinleri	7
1.4.2 Kinaz sinyalizasyonu	7

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.4.3 İmmünite bileşenleri.....	8
1.4.4 Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyiciler	8
1.4.5 Hormon yanıtları	9
1.4.6 Biyotik stres- reaktif oksijen türleri	9
1.5 GABA ile İlgili Genel Bilgiler	10
1.6 Bitkilerde GABA Metabolizması.....	11
1.6.1 GABA metabolizmasında yer alan enzimler.....	12
1.7 GABA Taşınımı	13
1.8 Bitkilerde GABA Fonksiyonu ve Önemi	14
1.8.1 Böceklere karşı savunma.....	14
1.8.2 Streslere karşı koruma.....	15
1.8.3 Uyumlu ozmolit olarak GABA	15
1.8.4 Bitki gelişiminde GABA	15
1.8.5 GABA-meyve gelişimi.....	15
1.8.6 Azot kaynağı olarak görevi	16

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.8.7 GABA'nın sinyal molekülü olarak rolü	16
1.9 GABA Reseptörleri	16
1.10 GABA Shunt ile TCA Döngüsü Etkileşimi	17
1.11 Azot Metabolizması ile GABA Shunt Etkileşimi	18
1.12 Poliamin Degredasyon Yolağı ile GABA Birikimi.....	19
1.13 Tütün Bitkisi.....	20
1.14 Hipotez	20
2. MATERİYAL VE METOD	21
2.1 Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi.....	21
2.2 Biyotik Stres Uygulaması.....	21
2.3 Büyüme Parametreleri.....	22
2.3.1 Klorofil floresans ölçümü.....	22
2.3.2 Bağlı su miktarı	22
2.4 Total Protein Miktarının Belirlenmesi	23
2.5 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	23
2.6 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.7 GABA Miktarının Belirlenmesi	24
2.8 Glutamat Miktarının Belirlenmesi	24
2.9 H ₂ O ₂ Saptanması ve H ₂ O ₂ İçeriğinin Belirlenmesi.....	25
3. BULGULAR	26
3.1 Fizyolojik Parametreler	26
3.1.1 Kök ve gövde yaş ağırlıkları	26
3.1.2 Kök ve gövde kuru ağırlıkları	28
3.1.3 Bağıl su içeriği	29
3.1.4 Fotosentetik verim.....	30
3.2 Enzim Aktiviteleri	30
3.2.1 Glutamat dehidrogenaz enzim aktivitesi	30
3.2.2 Glutamat dekarboksilaz enzim aktivitesi	31
3.3 Diğer Biyokimyasal Parametreler	32
3.4.1 Total protein miktarları	32
3.4.2 GABA miktarının belirlenmesi	32
3.4.3 Glutamat miktarının belirlenmesi.....	33

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.4.4 H ₂ O ₂ miktarının belirlenmesi	34
4. TARTIŞMA.....	35
5. SONUÇLAR	39
KAYNAKLAR DİZİNİ	41
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Abiyotik ve Biyotik stres sinyal yolları (Fujita et al, 2006'dan).....	1
1.2 Bitki İmmünesinin temel prensipleri(Dodss and Rathjen, 2010'dan)	6
1.3 Hidrojen peroksit tarafından düzenlenen ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olan biyolojik süreçler (Gechev and Hille, 2005'den).....	10
1.4 Bitkilerde GABA shunt metabolik yolağı ve düzenlenmesi (Bouche and Fromm, 2004'den)	11
1.5 GABA metabolizmasının bölmelendirilmesinin şematik gösterimi (Shelp et al, 2012'den)	14
1.6 Mitokondrial TCA döngüsünün sitosolik bypass edilmesi (Sweetlove et al, 2010'dan).	18
1.7 Bitkilerde GABA ve PA (Put, Spm ve Spd) için biyosentez ve degradasyon yolağı (Wang et al, 2014'den).....	19
3.1 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol, mock ve harpin uygulamasının 1,5, ve 7. günlerdeki etkilerinin genel görünümü	26
3.2 Kontrol, mock, harpin uygulamasının <i>Nicotiana tabacum</i> 'da kök yaş ağırlığı üzerine etkisi.....	27
3.3 Kontrol, mock, harpin uygulamasının <i>Nicotiana tabacum</i> 'da gövde yaş ağırlığı üzerine etkisi	27
3.4 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol, mock ve harpin uygulaması yapılan gruplarda kök kuru ağırlığındaki değişimler.....	28
3.5 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol, mock ve harpin uygulaması yapılan gruplarda gövde kuru ağırlığındaki değişimler	29
3.6 <i>N.tabacum</i> bitkilerinde kontrol, mock, harpin uygulaması yapılan gruplarda bağıl su içeriğindeki değişimler	29
3.7 <i>N.tabacum</i> bitkilerinde kontrol, mock, harpin uygulaması yapılan gruplarda fotosentetik verimdeki değişimler	30
3.8 Kontrol, mock, harpin uygulamasının <i>N.tabacum</i> bitkilerinde GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	31
3.9 Kontrol, mock ve harpin uygulamasının <i>N.tabacum</i> bitkilerinde GAD enzim aktivitesi üzerine etkisi	31
3.10 <i>N.tabacum</i> bitkilerinde biyotik stresin total protein içeriğine etkisi	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

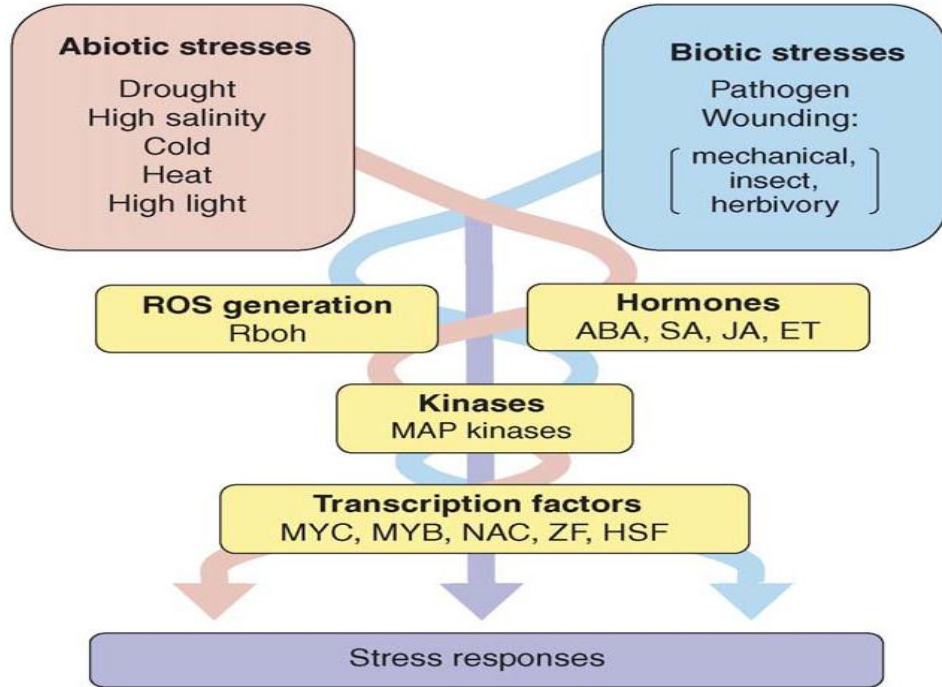
<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.11 <i>N.tabacum</i> bitkilerinde biyotik stresin GABA miktarları üzerine etkisi	33
3.12 <i>N.tabacum</i> bitkilerinde biyotik stresin Glutamat miktarları üzerine etkisi	33
3.13 <i>N.tabacum</i> bitkilerinde biyotik stresin hidrojen peroksit miktarları üzerine etkisi.....	34
3.14 <i>N.tabacum</i> bitkilerinde 7. günde kontrol, mock ve harpin uygulanan bitkilerde hidrojen peroksit birikiminin DAB boyama yöntemi ile belirlenmesi	34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
GABA	Gamma aminobütirik asit
GABA-T	GABA-transaminaz
GAD	Glutamat dekarboksilaz
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GHB	Gammahidroksibütirat
GR (GluR)	Glutamat reseptörü
SSA	Süksinik semialdehit
SSDH	Süksinik semialdehit dehidrogenaz
SSA	Süksinik semialdehit
ETI	Efektör ile tetiklenen immünite
PAMP	Patojen ile ilişkili moleküler örüntü
PTI	PAMP-tetiklenen immünite
PCD	Programlanmış hücre ölümü
HR	Aşırı duyarlı yanıt
HCD	Duyarlı hücre ölümü
LRR	Lösin zengin tekrar
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ROS	Reaktif oksijen türleri
<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
γ	Gamma

1. GİRİŞ

Tarımsal bitkiler ortam koşullarındaki hızlı değişimlere gösterdikleri duyarlılık nedeniyle ürün verimi açısından sahip oldukları genetik potansiyeli tam anlamıyla kullanamazlar. Bununla birlikte tarım bitkileri arasında özellikle çevresel streslere verilen yanıtlar ve stres koşulları altında ortalama ve maksimum verim açısından belirgin farklılıklar gözlenmektedir. Yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve besin maddesi stresleri gibi abiyotik stres faktörlerinin dünya tarımına üzerindeki etkisi oldukça büyüktür ve bu durum, önemli tarım bitkileri için %50 den yüksek düzeylerde ortalama ürün kayıplarına neden olmaktadır (Wang et al., 2003). Ayrıca bitkiler; funguslar, bakteriler, virüsler, nematodlar ve böcekleri kapsayan çok çeşitli zararlıların saldırılarına karşı kendilerini korumak durumundadır (Hammond-Kosack and Jones, 2000). Bitkilerin yaşam çevrelerinde maruz kaldıkları her çeşit stres, buldukları çevrede yaşamlarını sürdürebilmeleri ve nesillerini devam ettirebilmeleri için gerekli olan hücresel ve moleküler yanıt sistemini uyarmaktadır. Bununla birlikte bu sürecin devreye girmesi bitkisel gelişim ve üretimi önemli ölçüde azaltmaktadır.



Şekil 1.1 Abiyotik ve Biyotik stres sinyal yolları (Fujita et al., 2006).

1.1 Biyotik Stres

Bakteriyal ve viral patojenlerin yanı sıra biyotrofik ve nekrotrofik fungusları da içeren biyotik stres faktörleri tarımsal üretimi kısıtlayan önemli etkenler arasındadır. Evrimsel süreçte bitkiler ve biyotik stres faktörleri arasında karşılıklı olarak çok çeşitli etkileşimler ve savunma stratejileri gelişmiştir. Patojenlerin bitki savunma sistemlerini etkisiz hale getirmeleri bu stratejilerden biridir. Örneğin, 1999 yılında doğu Afrika'da, buğday bitkisinde gövde pasına neden olan *Puccinia graminis*'in patojeninin yeni nesli, buğday kültürlerinin %70 inde var olan ırk-spesifik direnç geni Sr31'e karşı direnç geliştirmiştir (Pretorius, 2000). 2000 yılında *Puccinia*'nın daha agresif bir formu olan *Puccinia striiformis* yeni nesil şeritli pas patojeni olarak A.B.D de görülmüştür ve A.B.D nin orta bölgesi boyunca salgın hastalıklara neden olmuştur (Hovmöller et al., 2008). Bu çeşit örnekler bitki-patojen etkileşiminin daha iyi anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır (McIntosh ve Pretorius 2011).

Pseudomonas, *Xanthomonas* ve *Ralstonia* genusları ile yapılan çalışmalar, sitoplazmik efektör (patojen tarafından bitki hücreleri içine transloke olan protein) tarafından yöneltilen biyotrof patojenezis için mevcut modeli oluşturmaktadır. Bakteriler (çoğunlukla bitkiden uzakta veya bitki yüzeyinde gelişmek için güçlü yetenekler ile) açıklık (stoma) yoluyla hareket ederler ve apoplastı parazitik nişleriyle yaralarlar ve bunu flajellin, LPS (lipopolisakkarit) , peptidoglikan ve uzama faktör TU (EF-Tu) gibi patojen (veya mikrop)-ilişkili moleküler örüntüler (PAMP) ile bitkilere aktarırlar. Bu yaygın mikrobiyal özellikler direk olarak yüzeyde bulunan örüntü tanıma reseptör-benzeri kinazlar tarafından tanınır ve PAMP-tetiklenen immünite (PTI) ortaya çıkar. Patojenler, yerleşen baskılayıcı sitoplazmik efektörler ile PTI nin üstesinden gelir. Bitkiler bu efektörlerin bir veya birkaçının aktivitesini hücreler içerisindeki direnç (R) proteinleri ile tanır. Patojenler, bir veya daha fazla efektör tarafından oluşturulan Efektörle-tetiklenen immünite (ETI) baskılamasını efektörün yayılmasıyla, efektör kodlayan genlerdeki mutasyonlar yoluyla üstesinden gelebilir. ETI, tipik olarak lokalize olan programlanmış hücre ölümü (PCD) ve kalitatif direnç ile ortaya çıkar. (Schneider and Collmer, 2010).

Nekrotrofik patojenlerin, patojenez stratejilerinde büyük çeşitlilik tanımlanmaktadır. Bunlardan biri; patojen tip II yolağı tarafından salgılanan pektik enzimlerin, hücre çeperi ve orta lamelin yapısındaki önemli pektik polimerlerdeki içsel glikozidik bağları parçalayarak doku maserasyonuna ve bitki

hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Bitkiler; patojen enzim aktivitesinin ürünleri olan oligogalakturonatlara karşı savunma yanıtlarını aktifleştirerek patojenler savunma baskılayıcıları ile birlikte pektik enzimleri etkisiz hale getirirler (Schneider and Collmer, 2010).

1.1.1 Virulans faktörleri ve Efektörler:

Virulans ve patojen faktörleri ayırımı yapmak bitki patolojisinde uzun bir tarihe sahiptir. Hastalık fizyolojisinin ve erken moleküler genetik çağın öncül amacı, patojenezis için esansiyel *kalitatif* patojenik faktörleri tanımlamak ve sonra patojen büyümesi ve semptom gelişimine katkı sağlayan *kantitatif* patojen faktörlerini belirlemektir. Moleküler genetik araçların kullanılabilir olması, moleküler Koch's varsayımı olan mutant virulans hatalarının dayanıklılığını esas alan virulans faktörleri ve patojenite ayırımı yapabilmeyi sağladı. Wassenaar & Gaastra (2001) virulans genlerinin anlaşılmasında, sınırın nerede çizilmesi gerektiği sorununun tartışılmasını ele aldığında, 2001 yılında önerilen alternatif yaklaşım virulans genlerini sınıflandırmak olmuştur. Önerilen üç sınıf, virulansa katkıdan ziyade virulansın genel fonksiyonlarına göre oluşturulmuştur. İlki, konakçı ile etkileşimde yer alan faktörleri üreten enzimler veya faktörler için doğru virulans gen kodu, enfeksiyon sırasında patolojik hasardan direk sorumludur. İkincisi, doğru virulans genlerin ürünlerinin yayılmasında yer alan faktörleri kodlayan virulans ile ilişkili genlerdir ve üçüncüsü, virulans yaşam döngüsü genlerinin kodladığı, reaktif oksijen ve fitoaleksinler gibi konakçı savunma toleransını veya konakçı kolonizasyonunu düzenleyen faktörlerdir. Daha sonraları, Hogenhout ve çalışma arkadaşları (2009), şuan da kullanılan efektörlerin genel tanımlamasını önermiştir. Bu tanımlama PAMP'ları içermektedir. Efektörün bu kullanımı, konakçı hedef ile direk etkileşime giren patojen molekülleri kapsama ve tek terim olma avantajına sahiptir (Schneider ve Collmer, 2010).

1.2 Harpin:

Gram-negatif bitki patojenik bakteri tarafından üretilen harpin proteinleri çeşitli bitki türlerinde çok yönlü fonksiyonlara sahiptir ve son 20 yılda oldukça dikkat çekmiştir (Li et al., 2014). İlk olarak harpin, *Erwinia amylovora* bakterisinde yüksek seviyede ifade olan hrp kümesini (cluster) taşıyan E.coli hücrelerinin sıvı kültüründe keşfedilmiştir (Alfano and Collmer, 1997). Harpinler, Gram-negatif bitki patojenik bakteriler tarafından üretilen glisin-zengin, proteaz-

duyarlı, ısı-stabil, asidik proteinlerdir, bakterilerin konakçısı olmayan bitkilerde aşırı duyarlı hücre ölümünü (HCD) indükler (Peng et al., 2003). Harpin proteini kodlayan hrpN geni, tütün bitkisinde aşırı duyarlı yanıt (HR) ortaya çıkarmak için *E.amylovora* dan sağlanan hrp gen kümesinin içinde lokalize olmaktadır (Baker et al., 1993). *P.syringae* pvs. *Phaseolicola* ve *syringae* türlerinde yapılan mutasyon analizleri, konakçı ve konakçı olmayan bitkilerde, HR ve hastalık meydana getirebilme yeteneğine sahip hrp genlerinin ifadesini ortaya çıkarmaktadır. Hrp genlerinin geniş kümesi farklı bakterilerden klonlanmıştır ve aşırı duyarlı reaksiyon oluşturmak için; proteine benzer harpin elisitörü, düzenleyici proteinler ve tip III sekresyon sisteminin komponentleri gibi özgün protein ürünleri için kod olan 6-8 transkripsiyon biriminden oluştuğu belirlenmiştir (Ichinose et al. 2001).

Transgenik bitkilerde ektopik ifadeden veya bitkilere eksternal uygulamadan sonra, harpin farklı yararlı etkileri indüklemek için ayrı sinyal yollarını aktive eder. Harpin proteine yanıtta, salisilik asit (SA) sinyal yolağı patojenlere karşı direnç indüklenmesini sağlamak için aktifleşir. Ayrıca harpin proteine yanıtta etilen sinyal yolağındaki iki farklı adım, etilen algılanması yönünde farklılaşır: İlki böcek zararlılarına karşı direncin indüklenmesine neden olur ve diğeri bitki büyüme gelişmesi ile sonuçlanır (Li et al., 2014). Harpin ile indüklenen savunma yanıtları, sitosolik Ca^{+2} içe-akışı ve reaktif oksijen türlerin (ROT) seviyelerinde yükselme ile karakterize edilmektedir. Ayrıca iyon kanalları, HIN1 ve HSR201 gibi HR ile ilgili genlerin ifadesi, PAL (fenil alanin amonyum liyaz) ve GST (Glutatyon S-transferaz) gibi genel stres ile ilişkili genler harpin uygulaması ile aktifleşmektedir. Son zamanlarda transkriptom analizleri, harpin ile indüklenen gen ifadesinin Arabidopsis de savunma yanıtları, sinyal iletimi, hücresel iletişim ve hücre duvar biyogenezinde yer aldığını göstermektedir.

Birçok çalışma, harpin ile indüklenen dirençte SA aracılı sinyal yolağının rolünü belirtmektedir. Harpin uygulaması, Arabidopsis hücrelerinin SA alınımını ayarlar. İlave olarak son çalışmalar, harpin-indüklenen bitki gelişimi ve savunma yanıtlarında etilen sinyalinin etkisini de belirtmektedir (Chuang et al.,2010). Arabidopsis veya tütün süspansiyon hücre kültürlerinde harpin; K^{+} dışı akışı gibi erken yanıtları, büyüme ortamının alkalinizasyonunu ve plazma membranında depolarizasyon ile sonuçlanan H^{+} - ATPaz'ın inhibisyonunu indükleyici, ATP sentezinin hızlı inhibisyonunu indükler (El-Maarouf et al., 2001). Harpin kodlayan genlerin transformasyonu, Tütün, Çeltik, Brassica napus ve Pamuk bitkilerinde hastalık direncini geliştirir (Zhang et al., 2011).

1.3 Bitki İmmün Sistemi:

Bitkiler, hastalığa neden olabilen mikroplarca zengin çevrelerde yaşayan sesil organizmalardır. Bitkilerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için etkili savunma yanıtları, hızlı patojen algılama yeteneğine bağlıdır. Hareket edebilen savunucu hücreleri içeren memelilerin somatik adaptif immün (bağışıklık) sisteminin aksine bitkilerin immün yanıtları, patojen saldırısının tanınması ve bu saldırıya yanıt olarak her bir hücrenin yeteneğine, ayrıca enfeksiyon alanından meydana gelen sistemik sinyallere bağlıdır. Bitki savunmasının ilk hattı, mikroplar arasında yüksek düzeyde korunan patojen veya mikrop ilişkili moleküler örüntülerin (PAMPs veya MAMPs) tanınmasından sonra aktifleşmektedir (Rivas, 2012).

1.3.1 Hücre Dışı ve Hücre İçi Efektör Tanıma:

Bitkiler tarafından tanınan patojenle ilişkili moleküler örüntüler; ATP (Adenozin tri fosfat) gibi küçük molekülleri, lipidleri, proteinleri ve karbonhidratları içerir ve çok çeşitlidir. PRR (örüntü tanıma reseptörü), hücre dışı çevrede PAMP'ların varlığını tanıyan plazma membranında lokalize olan reseptörlerdir. PRR genellikle hücre dışı lösün-zengin tekrar (LRR) domaini ve hücre içi kinaz domaininden oluşur. BAK1 (Brassinosteroid duyarlı 1-ilgili kinaz 1), PAMP ile tetiklenen immünitenin merkezi düzenleyicisidir. Birçok PRR, PTI sinyal yolağını başlatmak için ilgili protein BAK1 ile etkileşime girer (Dodds and Rathjen, 2010) (Şekil 1.2).

Bitkilerde patojen duyarlı mekanizmaların ikincisi efektör ile tetiklenen immünitedir ve efektör proteinlerin hücre içi tanınması temeline dayanır. Tanınma durumları, çoğunlukla nükleotid bağlayıcı (NB) domainler ve LRR (lösün-zengin tekrar) içeren reseptör protein sınıfı tarafından düzenlenir. Bitki NB-LRR proteinleri; fungus, oomycetes, virüsler, bakteriler ve böcekleri içeren çeşitli patojenlere direnç sağlar. NB ve LRR domainleri, hayvanlarda doğuştan gelen immün yanıtlardaki PAMP indüklenmesinde yer alan NOD-benzeri immün reseptörlerde (NLR) bulunur (Dodds and Rathjen, 2010).

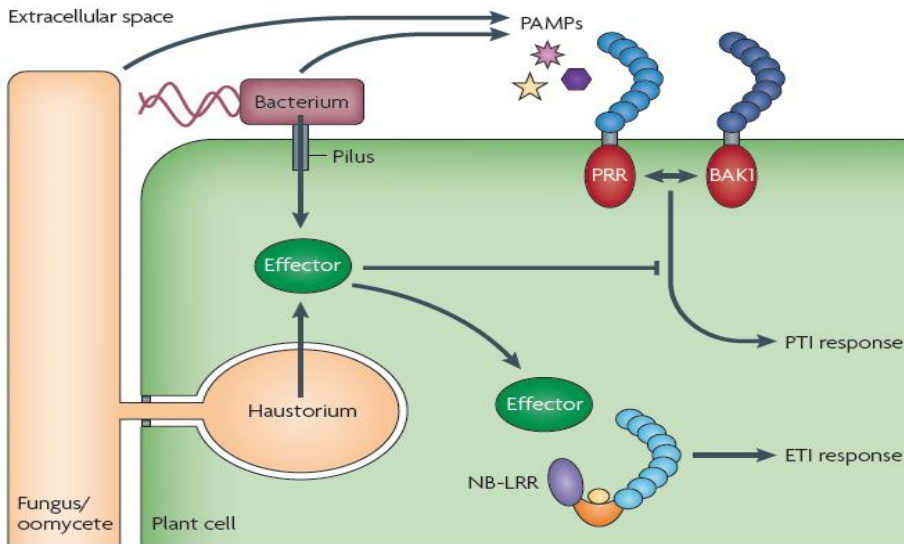
1.3.2 Bakteriyal ve Ökaryotik Efektör Fonksiyonları:

Bakteriyal efektörler; konakçı hedefte değişiklik yapma ve ETI reseptörleri tarafından hücre içi tanınma yeteneğine spesifik, moleküler veya enzimatik aktivitelere sahiptir.

Ökaryotik efektörler ve fonksiyonları hakkındaki veriler, bakteriyal efektör verileri ile karşılaştırıldığında kısıtlıdır. Fungal ve oomycete patojenler, efektörler üretir, endomembran sistem yoluyla salgırlar ve bilinmeyen mekanizmalar tarafından konakçı hücrelerin içine iletilir. Oomycetes efektörler karakteristik olarak, bitki hücrelerine iletim için gerekli olan içsel motif Arg-X-Leu-Arg (RXLR, X herhangi bir aminoasiti temsil eder) içerir. Ancak fungal efektör genlerin tanımlanması, genoma ait korunmuş motiflerin eksikliği sebebiyle kısıtlıdır, fakat farklı fungal patojenlerin genom analizleri ile kompleks genomlara sahip oldukları öngörülmektedir (Dodds and Rathjen, 2010).

1.3.3 NB-LRR Aktivasyonu:

NB-LRR, genel immün yanıtlarda direk veya indirek patojen sinyalini ileten korunmuş çoklu domain aktarıcısıdır. Çok sayıda genetik çalışmalar, LRR domaininin spesifik tanımayı kontrol ettiğini göstermektedir. Effektör tetiklemesinin yokluğunda, NB-LRR proteinleri baskılanmış konformasyonda kalır. NB domaini tarafından nükleotid bağlanması, tüm bitki NB-LRR proteinlerin fonksiyonları için çok önemli görülmektedir ve sinyal aktivasyonu, bağlayıcı alanda ATP ve ADP nin değişimini gerektirebilir (Dodds and Rathjen, 2010).



Şekil 1.2 Bitki immünesinin temel prensipleri (Dodds and Rathjen'den 2010)

1.4 Bitki Savunmasında Yer Alan Sinyal Yolakları

1.4.1 Bitki Direnç (R) Proteinleri:

Hastalık direnç genleri (R), bitki immün yanıtlarının spesifik belirleyicileridir. İmmün sistemde konakçı direnç geni ve patojen avirulans geni (avr) arasında allel-spesifik genetik etkileşim yer alır. Bu genetik etkileşim meydana geldiğinde, savunma yanıtları tetiklenir. Bu yanıt; hızlı Ca ve iyon akışı, hücre dışı oksidatif patlama, enfeksiyon alanında ve çevresinde transkripsiyonel yeniden programlanma ve bazı durumlarda HR olarak isimlendirilen programlanmış hücre ölümü ile karakterize edilmektedir. Bu durumların tamamının patojen büyümesini durdurmaya neden olduğu düşünülmektedir. Spesifik tanınma olmadığında, flajellin ve lipopolisakkaritler gibi PAMP'lar tarafından başlatılan bazal savunma yanıtları meydana gelir. Bazal savunma yanıtı, R proteininin aracılık ettiği savunma ile önemli ölçüde örtüşmektedir. Bazal savunma patojen kolonizasyonunu önlemez fakat yayılma alanını sınırlar. R proteinlerinin hareketi, bazal savunma yanıtlarını hızlandırıcı ve kuvvetlendiricidir (Belkadir et al., 2004). Farklı direnç (R) proteinlerinin, nükleus ve sitoplazma arasında dinamik bir şekilde yer aldığı belirtilmiştir (Caplan et al., 2008). Örneğin, Arabidopsis RPS4 proteinini ifade eden AvrRps4, *Pseudomonas syringae* pv domates DC3000 direnç sağlar ve çeşitli patojenlere karşı direncin geliştirilmesinde RRS1-R ile birlikte fonksiyon gösterir. Fonksiyonel NLS (nüklear lokalizasyon sinyali) içeren RPS4 endomembranlar ve nükleus arasında dağıtılır. RPS4 nüklear birikimi, AvrRps4 tarafından aktivasyon sürecinde immüitenin tetiklenmesi için gereklidir (Rivas, 2012).

1.4.2 Kinaz Sinyalizasyonu:

MAPK (mitojen-aktive edici protein kinaz) yolağı, ökaryotlarda aynı zamanda her yerde bulunan sinyal iletim bileşenleridir ve hücrel yanıtlara hücre dışı reseptörlerden sinyali iletir. MAPK kaskatı tipik olarak; MAPK fosforlayan MAPK kinaz (MAPKK) ve MAPKK fosforlayan MAPK kinaz kinaz (MAPKKK) modüler kompleksinden oluşur. Bu yolaklar, transkripsiyon faktörleri ve protein kinazlar gibi çeşitli substratların aktivitelerini düzenler. MAPK kaskatları, ETI ve PTI da yer almaktadır. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde flajellin algılanmasının downstream kısmında hareket ettiği varsayılan MAPK kaskatı karakterize edilmiştir. Bu MAPK kaskatı, MPK3 ve MPK6'nın upstream kısmında MKK4 ve MKK5 den oluşmaktadır ve WRKY-tip transkripsiyon faktörlerinin

aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu kaskat, savunma genlerinin ifadesi ile son bulmaktadır. Ayrıca aktif MKK4 ve MKK5, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *Pseudomonas syringae* tarafından enfeksiyona direnç sağlar (Dodds and Rathjen, 2010).

1.4.3 İmmünite Bileşenleri

R ve efektör proteinleri nükleus ve sitoplazma arasında bitki immün yanıtının düzenlenmesinde esansiyeldir. İki bölme arasındaki savunma sinyal trafiği için bir iskelet sağlar. İmmün bileşenlerinin bu dinamik trafiğinin en iyi karakterize edilen örnekleri Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1), Phytoalexin Deficient4 (PAD4) ve Senescence-Associated Gene 101 (SAG101) dir. Bu genler tarafından bitki immün düzenleyici kompleksinin biçimlendirilmesi sağlanır. Ayrıca bu genlerin ortak aktiviteleri ve karşılıklı dengeleyici etkileri, birçok çevresel stres uyarılarına yanıt için esansiyeldir. EDS1, PAD4 ve SAG101 birlikte bitki spesifik proteinlerin bir ailesini oluşturmaktadır ve ökaryotik lipazlar ile homoloji göstermektedir. EDS1 homodimerleri çoğunlukla sitoplazmada bulunuyor iken, EDS1-PAD4 heterodimerleri hem nükleus hem de sitoplazmada bulunmaktadır. Nüklear EDS1 havuzu, savunma ile ilgili genleri ve salisilik asitin transkripsiyonel olarak yeniden programlanmasını yönlendirir. Önemli olarak, nüklear EDS1 havuzu ile sitoplazmik EDS1 havuzunun dengesi, tam direnç için gereklidir (Rivas, 2012).

1.4.4 Transkripsiyon Faktörleri Ve Düzenleyiciler:

Transkripsiyonel yeniden programlama, *Arabidopsis* genlerinin yaklaşık % 25'inin transkript seviyelerinin değişmesi ile patojen enfeksiyonuna yanıt olarak bitki savunmasının gerçekleşmesinde önemli bir adımdır. Gen ekspresyonunun bu dinamik düzenlenmesi, Transkripsiyon faktörleri (TF) ve düzenleyicilerin iletişimine bağlıdır. WRKY, ERF, TGA, Whirly ve MYB faktörleri gibi birçok TF ailesinin üyesi, bireysel savunma-ile ilgili genlerin promotorlarına bağlanarak, onların ifadelerini düzenler. *Arabidopsis* TF AtMYB30 tarafından VLCFA-ile ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonu, bakteriyel enfeksiyon sırasında etkili bir savunma cevabı için gereklidir (Rivas, 2012). Tütün *Nicotiana attenuata* bitkisinde yapılan denemeler, iki WRKY geninin, NaWRKY3 ve NaWRKY6, herbivorlara yanıtları düzenlediğini göstermiştir (Rushton et al., 2010). Tütün bitkilerinde tek ERF geni, *Tobacco stress-induced gene 1 (Tsi)* yüksek derecede

ifade olduğunda osmotik stres ve patojen atağına direncin arttığı saptanmıştır (Singh et al., 2002).

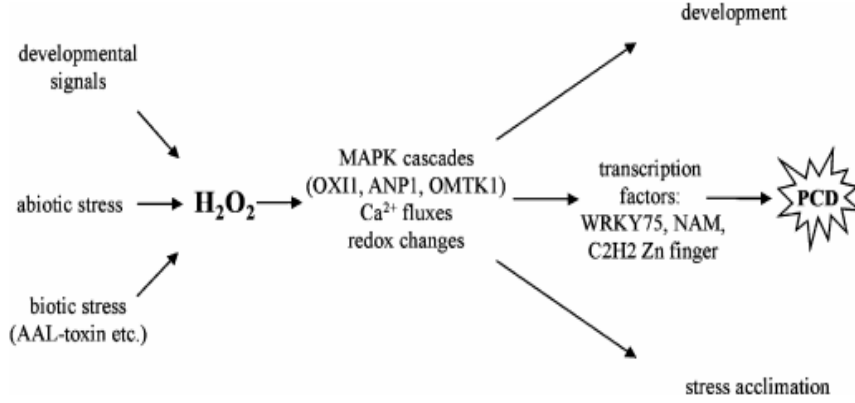
1.4.5 Hormon Yanıtları:

JA, SA ve ET gibi sinyal moleküllerinin konsantrasyonları patojen enfeksiyonundan sonra artar ve savunma için sinyalizasyonda anahtar rol oynar (Maldonado-Calderon et al., 2012). Bitki hormonları arasında JA, birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Ayrıca çok çeşitli herbivorlar ve nekrotrofik mikroorganizmalara immün yanıtın aktivasyonunda yer alan önemli hücresel sinyaldir (Gimenez-Ibanez and Solano, 2013). SA, JA ve ET'in önemi, bitki savunmasının düzenlenmesinde birincil sinyal olarak yer almalarıdır. Konakçıda yaşamayı gerektiren patojenler (biyotroflar) yaygın olarak SA ile düzenlenen savunma yanıtlarına daha duyarlıdır, ancak konakçı yaşamını sonlandıran ve konakçıdan beslenenler (nekrotroflar) ve herbivor böceklerle karşı JA/ET-aracılı savunma genellikle etkili olur. SA, JA ve ET sinyal yolları arasındaki crosstalk, bitki immüncesinin önemli düzenleyici mekanizmaları olarak ortaya çıkmaktadır. Örneğin, yaban tıp tütün bitkisinde (*Nicotiana attenuata*), herbivor-türevli elisitörler tarafından JA ve ET artışının tetiklendiği, SA artışının ise engellendiği belirlenmiştir ve savunma yanıtları SA-JA sinyal etkileşiminin ayarlanması ile gerçekleşmiştir (Verhage et al., 2010).

1.4.6 Biyotik Stres- Reaktif Oksijen Türleri

ROT, patojen ataklarına savunma yanıtları olarak bitkilerde hızlı olarak üretilmektedir (Neill et al., 2002). ROT'ların direk koruyucu etkisine ilave olarak bitki immüncesinde sistemik sinyal ağında ikincil mesajcı olarak da görev yapar ve HR tetiklenmesine, fitoaleksinin üretimine, savunma genlerinin ifadesine yol açar. Aşırı duyarlı yanıt, enfeksiyonun başlama bölgesinde patojen etkisini kısıtlamak için bitkinin enfekte hücrelerinin programlanmış ölüm şeklidir. Patojen atağının tanınması sırasında erken meydana gelen durumlardan biri; hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve tekli oksijen (1O_2) ile tanımlanan ROT'ların birikimidir ve bunlar patojenlere zarar verir (Jindrichová et al., 2011). H_2O_2 , fotosentez ve mitokondriyal solunum gibi elektron taşınım süreçleri sırasında süperoksit aracılığı ile üretilir. Patojen atağı sırasında üretilen H_2O_2 , hücre duvarı proteinlerinin bağlantısını ve bitki hücre duvarına bağlanan fenollerini düzenler. Patojenlere karşı savunma ve aşırı duyarlı yanıt sırasında H_2O_2

ve nitrik oksit arasındaki etkileşim programlanmış hücre ölümü için esansiyeldir ve bu iki sinyal arasındaki denge hücre ölümünü düzenler (Neill et al., 2002).



Şekil 1.3 Hidrojen peroksit tarafından düzenlenen ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olan biyolojik süreçler (Gechev and Hille, 2005)

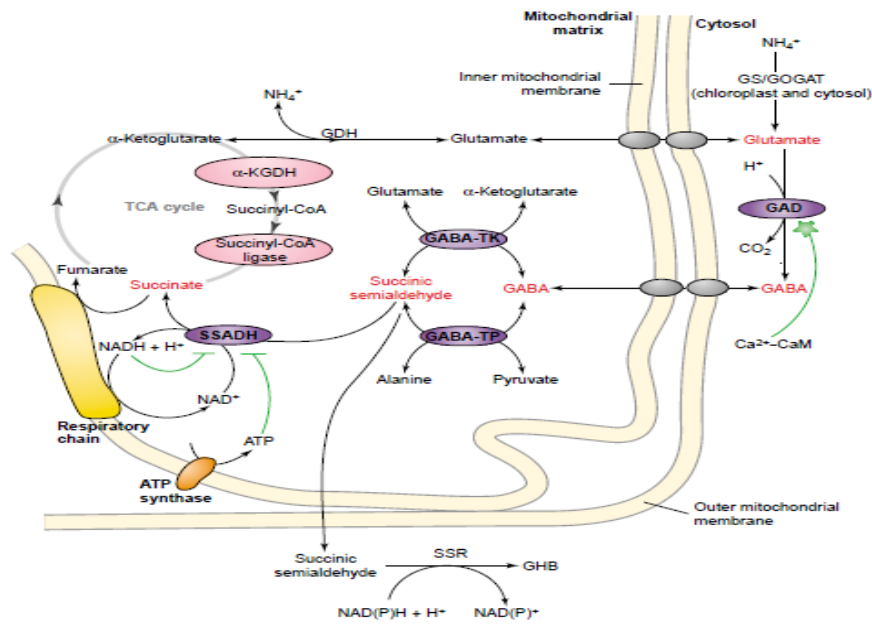
1.5 GABA ile İlgili Genel Bilgiler

GABA dört karbonlu, moleküler ağırlığı 103.1 dalton olan proteinik yapıda olmayan bir aminoasittir. GABA; bakteriler, bitkiler, mantarlar ve memeliler gibi çok çeşitli canlı gruplarında sentezlenir (Bown and Shelp, 1997). GABA ilk kez, 1949 yılında patates (*Solanum tuberosum*) yumru dokularında saptanmıştır (Kinnorsley and Turano, 2010). Kısa bir süre sonra omurgalılarda da keşfedilmiştir. GABA'nın hayvanlarda keşfedilmesinden sonra GABA'ya duyulan ilgi hayvanlara doğru yönelmiştir. Omurgalılar ile karşılaştırıldığında, bitkilerdeki GABA'nın rolü hala tam olarak belirlenememiştir. Hayvanlarda GABA, beyinde yüksek seviyede saptanmıştır ve temel inhibitör nörotransmitter olarak karakterize edilmiştir. Bitkilerde ise GABA'nın keşfi ile ilgili ağırlıklı olarak metabolik fonksiyonu üzerine odaklanılmıştır. Ayrıca bu aminoasidin stres koşullarında ve C/N metabolizmasına yanıtta önemli bir sinyal rolü olduğu belirlenmiştir (Bouché and Fromm; 2004). Farklı streslere (abiyotik ve biyotik) yanıtta özellikle sürgün dokularında GABA'nın önemli derecede hızlı birikimi tespit edilmiştir (Fait et al., 2008). Sürgün dokularının dışında kök, nodül, kültüre edilmiş bitki hücreleri, çiçek ve meyve gibi bitkinin çeşitli kısımlarında GABA birikimi belirlenmiştir ve GABA, bitkilerde serbest aminoasit havuzunun temel bileşenidir (Shelp et al., 1999). Azot eksikliği, CO₂ artması, ısı şoku, hipoksiya, kuraklık, soğuk, UV stresi koşullarına bağlı olarak GABA birikiminin uyarılması gerçekleşmektedir (Shelp et al., 2009). Bitkilerde sitozolik pH düzenlenmesi,

ROT'ların süpürülmesi, oksijen eksiliğine karşı korumada, geçici azot depolamada ve pestisitlere karşı bitki korunmasını içeren bir çok süreçte GABA'nın metabolik fonksiyonu gösterilmiştir (Shelp et al., 1999).

1.6 Bitkilerde GABA Metabolizması

Bitkilerde ve hayvanlarda iki hücresel bölmede yer alan GABA metabolizması üç enzimli bir yolakta değerlendirilir. Bu yolağa GABA Shunt denilmektedir (Şekil 1.4). Sitosolik glutamat dekarboksilaz (GAD, EC 4.1.1.15) aktivitesiyle GABA temel olarak L-glutamattan sentezlenir (Renault et al., 2010). Daha sonra GABA transaminaz (GABA-T, EC 2.6.1.19) ile katabolize edilmek için mitokondriye taşınır, GABA-T GABA'yı süksinik semialdehite (SSA) dönüştürür (Van Cauwenberghe et al., 2002). Ardından, SSA mitokondrial süksinik semialdehid dehidrogenaz (SSADH, EC 1.2.1.16) ile süksinata okside edilir (Busch ve Fromm, 1999). Alternatif olarak, gama hidroksibütirat (GHB) üreten gama hidroksibütirat dehidrogenazın aktivitesiyle SSA sitosolde indirgenebilir (Breitkreuz et al., 2003)



Şekil 1.4 Bitkilerde GABA shunt metabolik yoluğı ve düzenlenmesi (Bouché and Fromm, 2004).

1.6.1 GABA Metabolizmasında Yer Alan Enzimler

Glutamat Dekarboksilaz (GAD; EC 4.1.1.15)

Bitkilerde GAD enziminin fonksiyonu ve düzenlenmesi ile ilgili çalışmalar, petunya GAD genlerinin klonlanması ve Ca^{+2} -bağımlı kalmodulin (CaM)-bağlayan protein olarak kodlanan enzimin karakterizasyonu ile uyarılmıştır (Bouche and Fromm, 2004). Ayrıca GAD enziminin C-ucunda, kalmodulin bağlayan bölgenin sadece bitkilere özgü olduğu tespit edilmiştir (Shelp et al., 1999). GAD aktivitesi, glutamat için spesifiktir ve yaklaşık pH:5.8 de maksimum aktivite gösterir, Ayrıca GAD aktivitesi; Ca^{+2} -kalmodulin, pH tarafından düzenlenir ve sitosolde sınırlıdır. Birçok stres tarafından sitosolik Ca^{+2} seviyesinin artışı gerçekleşmektedir. Artan sitosolik Ca^{+2} formları kalmodulin (CaM) ile kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks (Ca^{+2}/ CaM) fizyolojik pH değişikliğinde GAD'ı aktive eder. GAD'ın aktif hale gelmesi sonucunda GABA birikimi sağlanır. Glutamat dekarboksilaz enziminin (GAD) düzenlenmesi bitkilerin büyümesinde, gelişiminde (Baum et al., 1996) ve meyvelerin olgunlaşmasında rol oynar (Bouche and Fromm, 2004).

GABA Transaminaz (GABA-T; EC 2.6.1.19)

GABA Transaminaz enzimi, amino asit alıcısı olarak α -ketoglutarat (GABA-TK) veya pirüvatı (GABA-TP) kullanır. GABA-T, pH: 9.0 -9.5 aralığında optimumdur ve mitokondride lokalize olmaktadır. GABA, GABA Transaminaz enzimi tarafından süksinik semialdehite dönüştürülür. Memelilerde sadece GABA-TK aktivitesinin varlığı tespit edilmiştir, bitkilerde ise her iki enzim aktivitesi de saptanmıştır. Arabidopsiste, sadece GABA-TP kodlayan genler izole edilmiştir. İn vitro çalışmalarda, rekombinant Arabidopsis GABA-TP, amin vericisi olarak pirüvatı kullanır, α -ketoglutaratı kullanmaz (Bouche and Fromm, 2004).

Süksinik Semialdehit Dehidrogenaz (SSADH; EC 1.2.1.16)

Süksinik semialdehit dehidrogenaz enzimi, süksinik semialdehite spesifiktir ve özellikle NADH oluşturmak için NAD^{+} 'ı kullanır. SSADH aktivitesi pH: 9.0 ve 10.0 aralığında optimumdur (Shelp et al., 1999). Önemli olarak, hem ATP hem

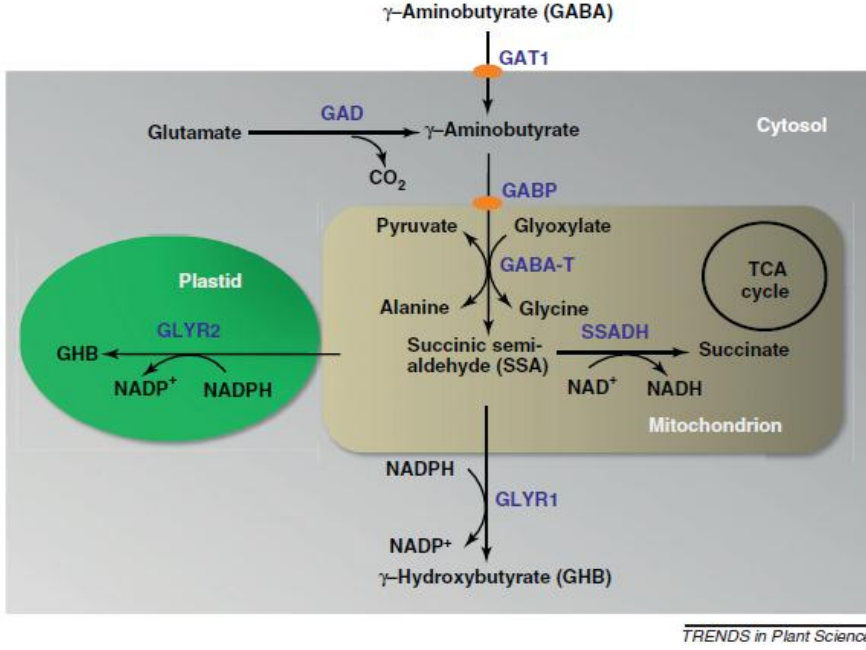
de NADH enzimin aktivitesini negatif olarak düzenler. SSADH tarafından katalizlenen reaksiyon ürünleri (süksinat ve NADH) mitokondriyal solunum zincirinin substratlarıdır ve son ürün olarak ATP üretilir (Bouche and Fromm, 2004).

Glutamat Dehidrogenaz (GDH; EC 1.4.1.2)

Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimi, 2-okzoglutaratın glutamata dönüşümünü sağlar. Bu reaksiyon omurgalılarda olduğu gibi bitkilerde de gerçekleşir. Daha sonra glutamat, glutamat dekarboksilaz (GAD) enzimi tarafından GABA'ya dekarboksillenir (Kathiresan et al., 1997). GABA, glutamatın dekarboksillenmesi ile oluşturulur ve mitokondride süksinik semialdehit yoluyla süksinata metabolize olur.

1.7 GABA Taşınımı

GABA varlığında *Arabidopsis*'in verimli büyümesi, bitkilerde GABA transporterlerinin bulunduğu dair kanıt oluşturmaktadır. GABA-taşınım eksik maya mutantlarının heterolog tamamlanması ile glisin, betain ve prolin gibi stresle ilişkili diğer bileşenler için daha az verimlilikte olan GABA ($K_m=1.7$ mM) taşıyıcısı *AtProT2* (*Arabidopsis thaliana* prolin transporter 2) tanımlanmıştır. Benzer substrat spesifikliği, *AtProT* ailesinin diğer 3 plazma membranında lokalize olan üyelerinde gözlenmiştir (Grallath et al., 2005). *ProT* ailesinin tamamına sekans benzerliği temeline dayanan *Arabidopsis* aminoasit transporter ailesinin (*AtGAT1*) üyesi, maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve kurbağa (*Xenopus laevis*) oositlerinde fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir ve plazma membranı boyunca GABA ($K_m= 47$ μ M) ve diğer ilişkili bileşenlerin yüksek afiniteli taşıyıcısı olarak hareket ettiği bulunmuştur (Meyer et al., 2006). Tütün (*Nicotiana tabacum*) protoplastlarında, *GAT1-GFP* füzyonunun geçici ifadesi, plazma membranında lokalize olduğunu açığa çıkarmıştır. Hücre içi fraksiyon ve immunoblotting ile yapılan Tütün yaprak ve protoplast çalışmalarında *GABP-GFP* (*Arabidopsis* APC(aminoasit/ poliamin/ organocation) transporter ailesi) geçici ifadesi, *GABP*'nin mitokondride lokalize olduğunu açığa çıkarmıştır (Michaeli et al., 2011).



Şekil 1.5 GABA metabolizmasının bölmelendirilmesinin şematik gösterimi (Shelp et al., 2012)

1.8 Bitkilerde GABA Fonksiyonları Ve Önemi

1.8.1 Böceklere Karşı Savunma

Herbivorlara karşı kimyasal savunma bitkiler için büyük önem taşımaktadır. Protein olmayan aminoasitlerde dahil olmak üzere primer ve sekonder metabolitler böcek zararlılarına karşı bitki savunmasında etkilidir. Buğday ve baklagilleri içeren bitki ailelerinde, böcek herbivorlarına direnç ile ilişkili protein olmayan aminoasitlerin yüksek seviyeleri belirlenmiştir (Huang et al., 2011). GABA seviyeleri genellikle hasar ile indüklenen Ca^{+2} akışı yoluyla bitki GAD aktivitesinde artışa neden olan böcek ataklarına yanıtta hızlı bir şekilde artmaktadır. GABA aktivitesinde daha ileri düzeyde artışlar, sitosolik pH'ın azalmasına ve vakuollerden asidik solüsyonların serbest bırakılması ile hücre bölmelerinin bozulmasına neden olur. Yapılan çalışmalarda GABA'yı yüksek miktarda üreten transgenik tütün bitkilerinin kuzey kök-düğüm nematoduna (*Meloidogyne hapla*) direnç sağladığı belirlenmiştir. Böcekler üzerine GABA'nın zararlı etkileri, böceklerde periferik sinir sisteminde önemli olan GABA-geçitli klorid kanallarının inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Huang et al., 2011). Ca^{+2} ve pH tarafından düzenlenmesi yoluyla GABA'nın hızlı birikimi böcek ataklarına spesifik değildir, fakat su baskını, soğuk, kuraklık, ısı, tuz ve mekanik hasar gibi abiyotik streslere yanıtta da meydana gelmektedir (Kinnersley ve Turano, 2000).

1.8.2 Streslere Karşı Koruma

Çevresel streslere yanıtta, GABA seviyelerinde artış farklı çalışmalarda görülmektedir (Kinnersley and Turano, 2000). Coleman et al., (2001) GABA yolağı enzimlerinde yapılan knock out mutasyonların Hidrojen peroksit (H₂O₂) duyarlılığı artırdığını belirlemiştir. Soya fasulyesi ve esmer pirinç bitkilerinde hipoksia koşullarında yapılan çalışmalarda GAD aktivitesinde ve GABA içeriğinde önemli derecede artış meydana gelmiştir. Domates bitkisinin düşük O₂ olan ortamda depolanması, GAD aktivitesinde artış ile sonuçlanmıştır ve GABA birikimine yol açan GABA-T aktivitesi azalmıştır (Yang et al., 2013). Ayrıca kuraklık, tuz, ağır metal ve yüksek sıcaklık stresleri uygulanan Susam (*Sesame indicum*) bitkisinde GABA seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Bor et al., 2009). Yapılan çalışmalarda, bitkilerde ROT'lar ile Ca⁺² sinyali arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmıştır. Bitkilerde Ca⁺² sinyalizasyonu ve GABA arasındaki bir diğer bağlantı *Arabidopsis* bitkisinde tanımlanan glutamat reseptör ailesinin üyelerini içermesidir. Glutamat reseptör ailesi, bitki hücrelerine Ca⁺² girişine aracılık etmektedir (Bouche et al., 2003).

1.8.3 Uyumlu ozmolit olarak GABA

Arabidopsis bitkisinde (AtProT2) ve Domates bitkisinde (LeProT1) prolin ve glisin betain gibi stres ile ilişkili bileşenleri taşıyan taşıyıcılar GABA'yı taşımaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda (25-200 mM), GABA, tuz stresi varlığında donma hasarına karşı izole edilmiş tilakoidleri stabilize eder ve korur (Shelp et al., 1999).

1.8.4 Bitki Gelişiminde GABA

Bilimsel çalışmaların büyük çoğunluğu, stres ile ilgili ve sinyal yolları üzerine GABA'nın fonksiyonel görevlerinin yorumlanması amacıyla taşımaktadır. Bu yaklaşımlara ilave olarak metabolit olarak GABA fonksiyonunun çoklu rolleri netlik kazanmıştır (Akihiro et al., 2008).

1.8.5 GABA-Meyve Gelişimi

Domates (*Solanum lycopersicum*) meyvelerinde, diğer bitki türleri ile kıyaslandığında GABA oldukça fazla bulunur. Ayrıca GABA ve glutamat domates meyvesinde en bol bulunan aminoasitlerdir. GABA içeriği, moneymaker,

kyouryoku-toukou ve çeri domates meyvelerinde çiçeklenmeden sonra artar ve olgun yeşil aşama sırasında maksimum seviyeye ulaşır. GABA, meyve gelişiminin erken aşamasında geçici azot deposu olarak görev yapar (Akihiro et al., 2008).

1.8.6 Azot Kaynağı Olarak Görevi

Protein sentezinin azalması, protein degradasyonunun artması, glutamin sentezinin engellenmesi gibi koşullarda glutamatın GABA'ya dönüşümü artar. Yapılan çalışmalarda, glutamat ve GABA'nın arjinin türevli karbon ve azot geri çevriminde bir araç olarak protein depolama ve hareketi esnasında üretildiğini gösterir. Böylece GABA shunt yoluyla glutamik asit metabolizması, bitkilerin azot durumunda dikkate değer öneme sahip olabilir (Shelp et al., 1999).

1.8.7 GABA'nın Sinyal Molekülü Olarak Rolü

Bitkilerde GABA'nın rolü hakkında bilinenler çok azdır (Kinnersley and Turano 2000). Yapılan çalışmalarda, SSADH geninin susturulması ile elde edilen *Arabidopsis* mutantlarında GABA shunt'ın işlevinin bozulduğu ve yüksek seviyelerde ROT birikimi sonucu nekrozis, büyüme engellenmesi ve çevresel strese karşı aşırı duyarlılık olduğu belirlenmiştir (Bouche et al. 2003; Fait et al. 2005). Memelilerde GABA, iyon kanallarının iletkenliğinde değişimler yaratan nörotransmitter inhibitörüdür (Zhang and Jackson, 1993). GABA, presinaptik yada postsinaptik memranlarda bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak sinaptik transmisyonun inhibe olmasına aracılık etmektedir. GABA reseptörleri kalp, karaciğer, ovaryum, testis gibi uyarılmayan organlarda da ifade olmaktadır (Calver et al. 2000). Tüm bu bulgular GABA'nın sadece beyinde değil diğer organlarda da sinyal molekülü olarak rol oynadığı saptanmıştır. Benzer bir şekilde GABA'nın bitkilerde de sinyal yolu ile ilişkili bir molekül olduğu düşünülmektedir (Kinnersley ve Turano, 2000; Bouche et al., 2003).

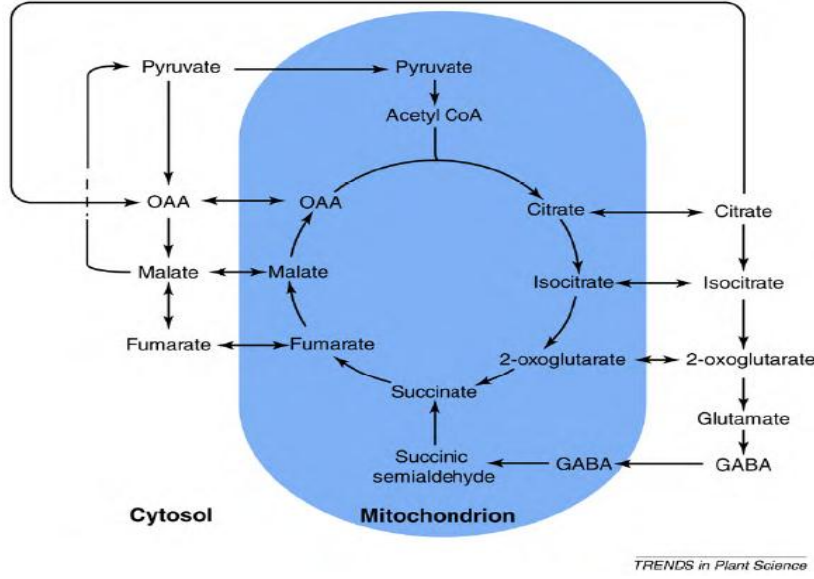
1.9 GABA Reseptörleri

Hücre sel sinyal yollarının aktifleşmesine neden olan ilk durum spesifik reseptöre, hormon gibi ligandın bağlanmasıdır. Organizmaların büyük çoğunluğunda GABA sinyal yolları aktifleştiği için, bu organizmalarda GABA reseptörleri bulunması gerekmektedir. Memelilerin merkezi sinir sisteminde GABA temel nörotransmitter inhibitörüdür. GABA, presinaptik yada postsinaptik

membranlarda bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak sinaptik transmisyonun inhibe olmasına aracılık etmektedir (Calver et al., 2000). Arabidopsis genomunda, hayvanlarda bulunan GABA reseptörlerine yüksek derecede homoloji gösteren genler bulunmasına rağmen GABA reseptörleri mevcut değildir. Ancak Arabidopsis genomunda yapılan çalışmalar, memeli iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluRs) ile sekans ve yapısal homoloji gösteren yeni 20 gen ailesi (AtGLRs) ortaya çıkarmıştır. Son veriler, AtGLRs'in bitki hücrelerine Ca^{+2} girişinin düzenlenmesi ve katyonların taşınımında yer aldığını öne sürmektedir (Bouche and Fromm, 2004).

1.10 GABA Shunt ile Tri Karboksilik Asit (TCA) Döngüsü Etkileşimi

GABA shunt ile TCA döngüsünün fonksiyonu birbirine bağlıdır (Studart-Guimaraes et al., 2007). Çünkü süksinik semialdehit; trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde iki yönlü olarak ve mitokondriyal elektron transport zincirinin elektron vericisi olarak kullanılmak üzere, SSA dehidrogenaz (SSADH) enzimi ile süksinata katabolize edilmektedir. GABA shunt hem prokaryotlarda hemde ökaryotlarda bulunan ve trikarboksilik asit döngüsünü 2 adımda baskılayan bir metabolik yoldur (Bouche ve Fromm., 2004). Son araştırmalar, bitkilerde TCA döngüsü ve GABA shunt arasındaki yakın fonksiyonel bağlantıyı meydana çıkarmaktadır (Fait et al., 2008). Domates (*Solanum lycopersicum*) hatlarında, artan GABA shunt aktivitesi ile mitokondriyal elektron taşıma zincirine önemli ölçüde süksinat miktarının ilave edilmesi sonucu süksinil-CoA ligaz (GABA shunt tarafından bypass edilen iki TCA döngüsü enziminden biri) ifadesinin baskılanması gerçekleşmektedir (Studart- Guimaraes et al., 2007). Benzer şekilde, yabani tip patates (*Solanum tuberosum*) tüberlerinin 2-oxoglutarat'ın (2-oxoglutarat dehidrogenazın seçici inhibitörleri, GABA shunt tarafından bypass edilen ikinci TCA döngüsü enzimi) fosfonat analogları ile inkübe edildiğinde, GABA shunt'ın aktivitesinde artış gözlenmiştir (Sweetlove et al., 2010).



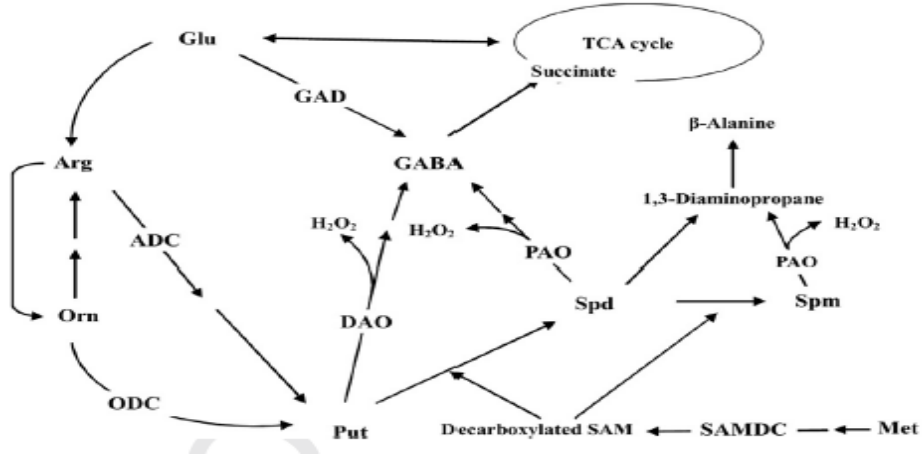
Şekil 1.6 Mitokondrial TCA döngüsünün sitosolik baskılanması. (Sweetlove et al., 2010)

1.11 Azot Metabolizması İle GABA Shunt Etkileşimi

Bitkilerde sinyal iletim yolları, gen ifade düzenlenleyicileri, taşıyıcılar, reseptörler gibi kompleks mekanizmaların koordinasyonu C:N arasındaki dengenin hassasiyetini, şeker seviyesinin düzenlenmesini, azot alınımını ve azot içeriğini içerir. GABA shunt, C:N dengesini içeren azot metabolizmasının bir parçası olarak görülmektedir. Çoğunlukla inorganik azot, glutamin sentetaz/ glutamat sentaz (GS/ GOGAT) yolağı yardımıyla glutamat üreterek asimile edilir, GABA da çoğu aminoasitin sentezindeki başlangıç noktasıdır. GAD seviyeleri değiştirildiğinde glutamat seviyeleri çok ciddi şekilde etkilenebilmektedir (Baum et al., 1996) GAD'ı aktif bir şekilde ifade eden transgenik bitkiler ile yapılan çalışmalarda glutamat seviyesinin azaldığı saptanmıştır. Bu bulgu, GABA sentezinin glutamat içeriğine sıkı bir şekilde bağlı olduğunu düşündürür ve 2002 yılında GABA'nın glutamat üretimini tamponlama da dominant bir role sahip olduğu hipotezi ortaya atılmıştır (Masclaux-Daubresse et al., 2002). Bu bulgu geçici azot depo metaboliti olarak GABA'nın rolü olduğunu doğrulamıştır (Shelp et al., 1999). GABA ve azot metabolizmasındaki güçlü korelasyon bitkilerde saptanmıştır. Arabidopsiste, GABA'nın sinyal ve spesifik fonksiyonunun azot metabolizması ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Barbosa et al., 2010).

1.12 Poliamin Degredasyon Yolağı İle GABA Birikimi

GABA sentezi iki farklı yolak üzerinden gerçekleşmektedir, ilki GAD enziminin katalitik etkisi ile glutamatin dekarboksilasyonu, ikincisi ise diamin oksidaz (DAO) ve poliamin oksidaz (PAO) enzimlerinin katalitik etkisi ile poliamin (PA) degradesyonu ile gerçekleşmektedir. Bu sebeple GABA ve PA arasında yakın etkileşim bulunmaktadır (Şekil 1.7). GABA ayrıca DAO'nun anahtar enzim olduğu poliamin degradesyon reaksiyonundan γ -aminobütiraldehit aracılığıyla da oluşabilmektedir. Stres koşulları (hipoksiya, tuz stresi, sıcak ve soğuk şoku, kuraklık, mekanik zedelenme vb.) altında GAD ve DAO aktiviteleri GABA oluşumu için güçlü bir şekilde uyarılmaktadır. Yapılan son araştırmalar, hipoksi (oksijen azlığı) koşullarında *Vicia faba* (Bakla) çimlenmesinde GABA oluşumunun yaklaşık %30'unun poliamin degradesyon yolağı ile sağlandığı gösterilmiştir (Wang et al., 2014).



Şekil 1.7 Bitkilerde GABA ve PA (Put, Spm ve Spd) için biyosentez ve degradesyon yolağı (Wang et al., 2014).

1.13 Tütün Bitkisi

Tütün bitkisi yeni dünyanın keşfinden sonra Avrupaya getirilmiş ve daha sonra diğer ülkelere hızlıca yayılmıştır (Dewey and Xie, 2013). Tütün, Solanaceae familyasına ait tek yıllık otsu bitkidir. *N.tabacum* L. dünyada tarımsal ürün olarak en önemli ticari değere sahip bitkilerden biridir. Ayrıca, sesquiterpenler, diterpenoidler, alkaloidler, fenoller gibi birçok kullanışlı kimyasal bileşenleri içerir (Chen et al., 2012). Tütün ürünlerini kullanan dünya populasyonunda tahminen 1.3 milyar kişi vardır (Rabinoff, 2007). N. Tabacum kök ve gövdesi, tütün bitkisinde ürünün büyük miktarını oluşturmaktadır. N.tabacum kök ve gövdesinin çok amaçlı kullanımı güncel bir konudur ve daha fazla ilgi çekmektedir (Chen et al., 2012)

Tütün, yapraklı bitkidir ve yüksek biyokütle verimine sahiptir (hektar başına yaprak biyokütlesi 100 ton kadar) ve birçok diğer model ve tahıl türleri ile karşılaştırıldığında yüksek çözülebilir protein seviyesine sahiptir, bitki üretim alanı için cazip özelliktedir. Bunun yanı sıra *Nicotiana tabacum* yeşil biyoreaktörler için temel platformdur. Ayrıca, agrobakterium veya viral indüksiyon ve stabil nükleer veya kloroplastik genom tabanlı ifade yoluyla geçici ifade gibi önemli proteinlerin ifadesinin çeşitli yollarını sunar (Menassa et al., 2001).

1.14 Hipotez

Yapılan detaylı literatür araştırması sonucunda ve daha önceki projelerimizden elde ettiğimiz bilgiler ışığında GABA metabolizması ile harpin ile indüklenen biyotik stres arasındaki etkileşimi belirlemeyi hedefledik. Araştırma projemizin hipotezi; GABA metabolizması ile biyotik strese verilen yanıtlar arasında bir ilişkinin bulunduğu ve bu ilişkinin dolaylı veya doğrudan H₂O₂ gibi ROT'ların birikimi ile ilgili olmasıdır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali Ve Yetiştirilmesi

Çalışmalarda *Nicotiana tabacum* bitkisi materyal olarak kullanılmıştır. *Nicotiana tabacum* tohumları 10 dakika % 10'luk hipoklorit çözeltisinde tutularak yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tohumlar steril deiyonize su (dI-H₂O) ile 5'er kez yıkanmıştır. Tohumların sterilizasyon ve ekim işlemleri Nüve MN 120 marka steril kabinde yapılmıştır.

Tohumlar Murashige-Skoog (MS) ortamında çimlendirilmiştir. Besin ortamının pH'ı 5.8 olarak ayarlandıktan sonra sükröz ve agar ilave edildi. Besin ortamı 121 °C'de 1,4 atm basınç koşullarında Nüve marka otoklavda sterilize edildi. Ortam otoklavlanma işleminden sonra oda sıcaklığına ulaşana kadar bekletildi. Besin ortamı otoklavlanmış kültür kaplarına (Magenta, Sigma) her birine yaklaşık 25'er ml gelecek şekilde boşaltılmıştır. Ortam magentalarda donduktan sonra steril kabinde sterilize edilmiş tohumlar her bir magentaya 9-10'ar tohum olacak şekilde ekilmiştir.

Tohumlar, 16 saat ışık/ 8 saat karanlıkta 25/23 °C'de nem oranı % 70 olan 350 µmolm⁻²s⁻¹ ışık yoğunluğunda çimlendirildi. Çimlenme ekim işleminden sonraki 7. ila 10. günler arasında gözlenmiştir. Çimlenmeden 1 ay sonra bitkiler içinde perlit bulunan saksılara aktarıldı. Perlit saksılara konulmadan önce saf su ile yıkanarak ıslatıldı. Perlite aktarılan bitkiler ½ oranında seyreltilmiş Hoagland ile sulanmıştır (Hoagland and Arnon, 1950). Perlite büyüme devam eden bitkiler kontrol koşullarında (16 saat ışık/ 8 saat karanlık, 25/23 °C sıcaklık, nem oranı % 70, 350 µmolm⁻²s⁻¹ ışık yoğunluğu) büyütülmeye devam edilmiştir.

2.2 Biyotik Stres Uygulanması

Bitkiler yaklaşık 4-5 haftalık büyüklüğe ulaştığında stres uygulaması gerçekleştirilmiştir. Biyotik stres uygulaması, harpin elisitörü (Messenger, EDEN Bioscience Corporation) ile ticari preparatın (3% w/w) 300 mg/mL⁻¹'lik stok çözeltisinden 1 µM konsantrasyon hazırlanarak yapılmıştır. Birbirinden bağımsız deneme serileri kurulmuştur ve bitkiler; kontrol grubu, harpin uygulanan grup ve dIH₂O uygulanan grup olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna uygulama yapılmamıştır, harpin uygulaması stok çözeltiden 1 µM konsantrasyon hazırlanarak yaprak dokularına infiltrasyon yolu ile gerçekleştirilmiştir, dIH₂O

uygulaması yaprak dokularına 1 μM konsantrasyon dH_2O infiltrasyon yapılarak oluşturulmuştur. Örneklemeler için 3. ve 4. yapraklar kullanılmıştır ve 7 günlük stres uygulaması süresince yapılmıştır. Örneklemeler: 0. Saat (s), 3.s, 6.s, 12.s, 24.s, 48.s, 5.Gün ve 7.Gün'lerde alınmıştır. Örnekler hasat edildikten hemen sonra sıvı azotta dondurularak analiz edilinceye kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

2.3 Büyüme Parametreleri

Nicotiana tabacum bitkisine biyotik stresin etkilerinin belirlenmesi için örneklemeler, harpin uygulanan, dH_2O uygulanan ve kontrol grubu olmak üzere 0., 1., 5. ve 7.günlerde seçilen bitkilerden yapılmıştır. Bitkilerin kök, gövde uzunluğu ve ağırlığı ölçülmüştür. Örnekler $70\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 72 saat bekletilip kurutulmuştur ve kuru ağırlıklar kaydedilmiştir.

2.3.1 Klorofil Floresans Ölçümü

Klorofil flüoresans ölçümleri, uygulamanın 0., 1., 5., ve 7. gününde yapılmıştır. Flüoresans ölçümlerinden önce, yaprak üst yüzeyindeki 1cm^2 'lik alan 20 dakika boyunca yaprak klipsleri kullanılarak karanlığa adapte edilmiştir. Bir bitki verim analizi Plant efficient analyser cihazı (Hansatech marka) kullanılarak yaprakların 20 doygun ışık demetine maruz bırakılmasıyla, değişken olmayan bazal klorofil flüoresansı (F_0), maksimum flüoresans uyarılması (F_m), değişken flüoresans (F_v) ve F_v/F_m oranları belirlenmiştir.

2.3.2 Bağlı Su Miktarı (RWC)

Yapraklardaki bağlı su miktarını belirlemek için, uygulamanın 0., 1., 5. ve 7. gününde 3 farklı bitkinin hasat sonrası yapraklarının yaş ağırlıkları (YA) tespit edilmiştir. Daha sonra bu yaprakların turgorlu hale gelmesi için 5 saat deiyonize suda bekletilmiştir. Yaprakların, fazla suyu alındıktan sonra turgorlu ağırlıkları (TA) tespit edilmiştir. Bu işlemin ardından, yapraklar 72 saat boyunca $70\text{ }^\circ\text{C}$ 'lik etüvde kuruması sağlanmıştır. Yaprakların kuru ağırlıkları (KA) tespit edildikten sonra RWC değerleri Smart ve Bingham (1972)'in aşağıda verilen formülüne göre hesaplanmıştır.

$$\text{RWC \%} = [(YA-KA)/(TA-KA)] \times 100$$

2.4 Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Total protein miktarını belirlemek için -80 °C'de saklanan yapraklar, soğutulmuş havanda sıvı azot yardımıyla, %2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve 1 mM EDTA içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 7.8) homojenize edilmiştir. Homojenat +4 °C'de 14.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürünün tümü +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Total protein miktarı Bradford (1976)'a göre bovine serum albumine (BSA) standartları kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin protein miktarları, 50 µl örnek ve 950 µl Bradford boyası içeren 1 ml'lik polistren küvetlerde ölçülmüştür. Kör ise, 50 µl Na-P tamponu (pH 7.0) ve 950 µl Bradford boyası ile hazırlanmıştır. Örnekler Shimadzu UV-1600 (Shimadzu, Japan) ile 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

2.5 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Örneklerdeki glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesi ölçümü için önce Akihiro et al. (2008)'a göre ekstraksiyon gerçekleştirildi. Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesini belirlemek için 1 g örnek 5 mM EDTA, 0,1 mM Tris-HCl, 10 mM ditiotritol (DTT), 1 mM piridoksal-5-fosfat hidrat ve 1/100 PVPP içeren 3,5 ml homojenizasyon tamponuyla (pH 7.8) homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar, tuzlarından arındırılması için PD-10 Desalting kolonlarından geçirildi. Daha sonra Amicon Ultra marka konsantratörler kullanılarak süpernatantlar konsantre edildi. Enzim aktivitesini belirlemek için 50 mM (NH₄)₂SO₄, 13 mM α-ketoglutarat, 0,25 mM NADPH ve 1 mM CaCl₂, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) içinde ayrı ayrı çözüldü. Reaksiyon karışımı için her bir çözeltilerden ve örneklerden 200 µl alınarak okuma yapılmıştır. Okumalar kuvartz küvetlerde 340 nm dalga boyunda 1 dakika boyunca köre karşı yapılmıştır.

2.6 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutamat dekarboksilaz enzim aktivitesi ölçümü için Bartysel et al. (2003)'un yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre dekarboksilasyon, 0,4 ml hacimde 3 mM L-glutamat, 20 µM pridoksal fosfat (PLP), 50 mM K-fosfat tamponu (pH 5,8) ve 100 µl örnek içeren reaksiyon karışımında gerçekleştirildi. Örnek, önce 10 dakika 30°C'de glutamat içermeyen reaksiyon karışımı ile inkübe edildi. Reaksiyon, glutamat eklenmesiyle başlatıldı ve 0,5 M HCl'den 0,1 ml eklenerek

60 dakika sonra durduruldu. Karışımlar 10 dakika 12.500 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında örnekler ninhidrin reaktifi ile türevlendirilerek, reaksiyon sonucu oluşan GABA miktarları belirlendi. Ninhidrin çözeltisi 0,35 % (w/v) etanolde çözülerek hazırlandı. Örnekler 1:5 oranında ninhidrin çözeltisi eklendi ve 10 dakika 80⁰C'de inkübasyon yapıldı. Oda sıcaklığına getirilen örneklerin, 570 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri belirlendi. Aynı koşullarda absorbans değerleri bilinen GABA standartları ile karşılaştırılarak örneklerdeki GABA miktarı saptandı. GAD aktivitesi enzim birimi olarak dakikada oluşan mmol GABA şeklinde hesaplanmıştır.

2.7 GABA Miktarının Belirlenmesi

Örneklerdeki GABA miktarı HPLC (Shimadzu-VP101, Japan) cihazı ile belirlenmiştir. GABA ekstraksiyonu Baum ve ark.'na (1996) göre, HPLC analizi ise Bor ve ark.'na (2009) göre yapıldı. Bitki örnekleri (0,5 g) sıvı azotta masere edildi ve üzerine 1 mL su: kloroform: metanol (3:5:12 v/v/v) solüsyonu eklendikten sonra örnekler 2 dakika süre ile 10.000 rpm 4⁰C'de santrifüj edildi. Süpernatant üzerine 100 µl dH₂O, 150 µl Borax tamponu (pH 8) ve 250 µl 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) (0,3 % w/v) eklendi. Karışım 20 dakika süre ile 80⁰C'lik sıcak su banyosunda bekletildikten sonra hacmi metanol ile 1 mL'ye tamamlandı ve örnek filtresinden geçirildikten sonra HPLC kolonuna uygulandı. HPLC koşulları; enjeksiyon hacmi 20 µl, Kolon Supelco LC18 (250 × 4.6 mm, 5µ), akış hızı 0.5 mL min⁻¹, Mobil faz metanol: su (62:38 v/v) ve dedeksiyon 330 nm UV şeklinde uygulandı. Örneklerdeki GABA miktarı aynı koşullarda yürütülen standartlarla karşılaştırılarak belirlendi.

2.8 Glutamat Miktarının Belirlenmesi

Glutamat miktarının belirlenmesi için ekstraksiyon Akihiro et al. (2008)'a göre gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonrası örnekler 10.000 g de +4 ⁰C 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alındıktan sonra miktar tayini için küvete; 2 ml dH₂O (25 ⁰C), 100 µl örnek, 500 µl içerisinde sodyum azide (0.02 % w/v) ilave edilmiş tampon (35 mL, pH 8.6) bulunan solüsyon 1, 200 µl solüsyon 2 (NAD⁺/INT) ve 50 µl süspanسیون 3 (diaphorase) ilave edildi. Yaklaşık 2 dakika, 492 nm'de spektrofotometrede köre karşı okunarak absorbans değeri (A₁) belirlendi. Daha sonra karışıma 50 µl solüsyon 4 (Glutamat dehidrogenaz solüsyonu) ilave edilerek 10 dakika aynı dalga boyundaki absorbans değeri (A₂) kaydedildi. Glutamat konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

Glutamik Asit içeriği (c) ;

$$\frac{V \text{ (Son hacim)(ml)} \times MW \text{ (Moleküler Ağırlık)}}{\epsilon \text{ (ekstinksiyon katsayısı)} \times \text{ışık yolu(cm)} \times \text{örnek hacmi (ml)}} \times \Delta AL - \text{glutamik asit (g/L)}$$

L-Glutamik Asit Miktarı ;

$$\frac{\text{cL-glutamik asit (g/L örnek hacmi)}}{\text{Örnek ağırlığı (g/L örnek hacmi)}} \times 100 \text{ (g/100g)}$$

2.9 Hidrojen Peroksit Saptanması ve Hidrojen Peroksit İçeriğinin Belirlenmesi

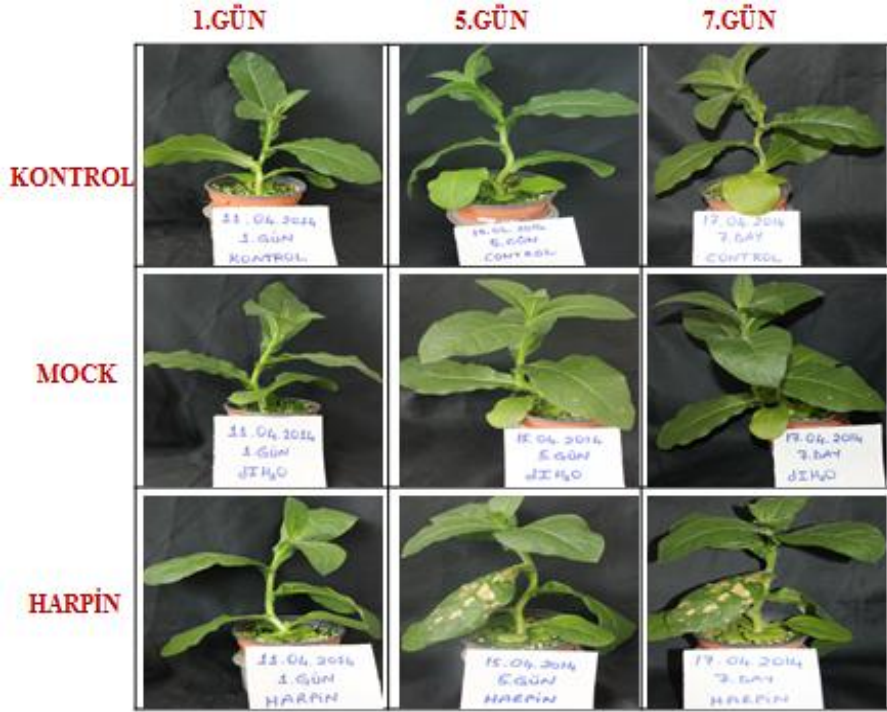
Hidrojen peroksit saptanması ve kantifikasyonu; 3,3'diaminobenzidine (DAB) (D5637, Sigma-Aldrich) ile Ramel et al. (2009) ve Daudi et al. (2012)'a göre yapıldı. Son hacim 1mg/ml olacak şekilde DAB kimyasalı, dH₂O içinde çözüldü ve KOH ile pH 3.8'e ayarlandı. Daha sonra 0.05 % v/v Tween 20 (pH 3.0) ilave edildi. Kontrol grubu, dH₂O uygulaması, harpin uygulaması yapılan bitkilerden uygulama yapılan birer yaprak seçildi ve boyutlarına uygun petri kaplarına yerleştirildi. Daha sonra üzerlerine DAB solusyonu eklendi ve 100 rpm de 4 saat karıştırıcı da bekletildi. Boyama tamamlandıktan sonra içindeki DAB solusyonu boşaltılıp, yerine asetik asit: gliserol: etanol (1:1:3) (v/v/v) solüsyonu eklendi ve sıcak su banyosuna aktarılarak 95 °C de 15 dakika bekletildi. Sıcak su banyosundan çıkarıldıktan sonra içindeki solüsyon boşaltılıp, tazelendi ve 30 dakika bekletildi. Yapraklardaki DAB boyama fotoğraf çekilerek kaydedildi.

Hidrojen peroksit kantifikasyonu için; DAB-boyama yapılan yapraklar sıvı azotta masere edildi ve 0.2 M HClO₄ ile homojenize edildi. Daha sonra 12,000 g de 10 dakika santrifüj edildi ve örnekler 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak, 0.2 M HClO₄-DAB de H₂O₂ içeriği bilinen standart eğri ile karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

3.1 Fizyolojik Parametreler

Tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisinde biyotik stres etkisi belirlemek için harpin uygulanan, mekanik stres etkisini belirlemek için dH₂O uygulanan (mock) grupların ve kontrol grubunun 0, 1., 5. ve 7. günlerdeki genel görünümü şekil 3.1’de verildi. Bununla birlikte büyüme verilerinde meydana gelen değişimler kantitatif olarak belirlendi. Kök, gövde yaş ve kuru ağırlıklarındaki, bağıl su içeriğindeki ve fotosentetik verimdeki değişimler de tüm gruplarda deneme süresi boyunca kaydedilerek karşılaştırmalı olarak incelendi.

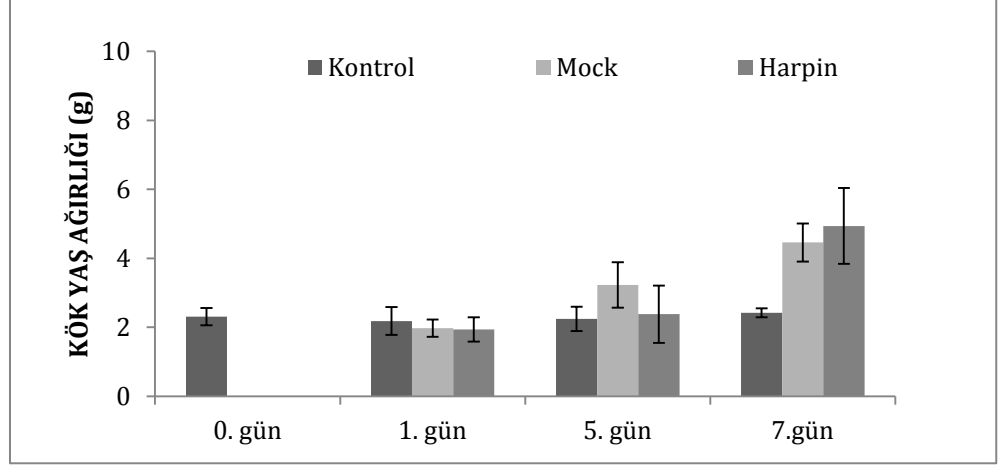


Şekil 3.1 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, mock ve harpin uygulamasının 1, 5 ve 7. günlerdeki etkilerinin genel görünümü.

3.1.1 Kök ve Gövde Yaş Ağırlıkları

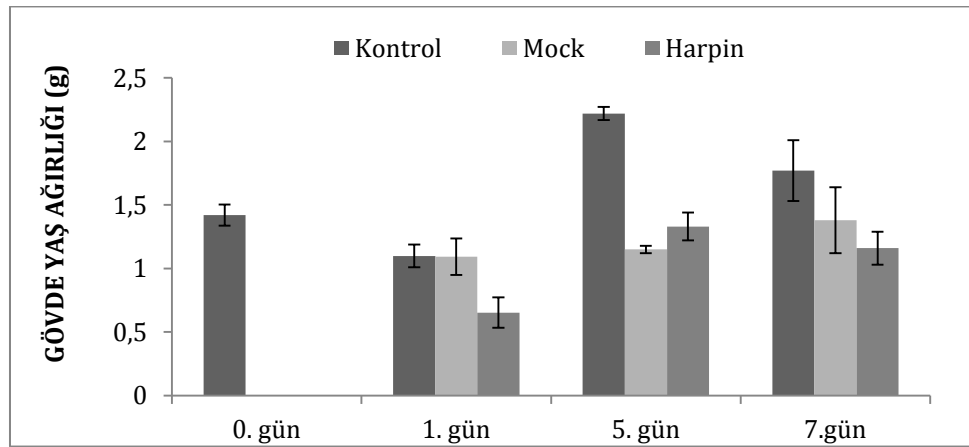
Kontrol, mock ve harpin uygulanan gruplarda kök ve gövde yaş ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Sonuçlara ait veriler şekiller 3.2 ve 3.3 de verildi. Kök yaş ağırlığında; stres uygulamasının 1. gününde farklılık gözlenmezken, 5. ve 7.günlerde kök yaş ve kuru ağırlıklarında belirgin değişimler kaydedildi. Kök yaş ağırlıkları stres uygulamasının 5.gününde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında,

mock grubunda % 44, harpin uygulanan gruplarda % 6 oranında artış gösterdi. Stres uygulamasının 7. gününde ise kök yaş ağırlıkları, mock grubunda, kontrol grubuna göre % 84, harpin uygulanan grupta ise yaklaşık 2 kat artış gösterdi.



Şekil 3.2 Kontrol, mock, harpin uygulamasının *Nicotiana tabacum*'da kök yaş ağırlığı üzerine etkisi

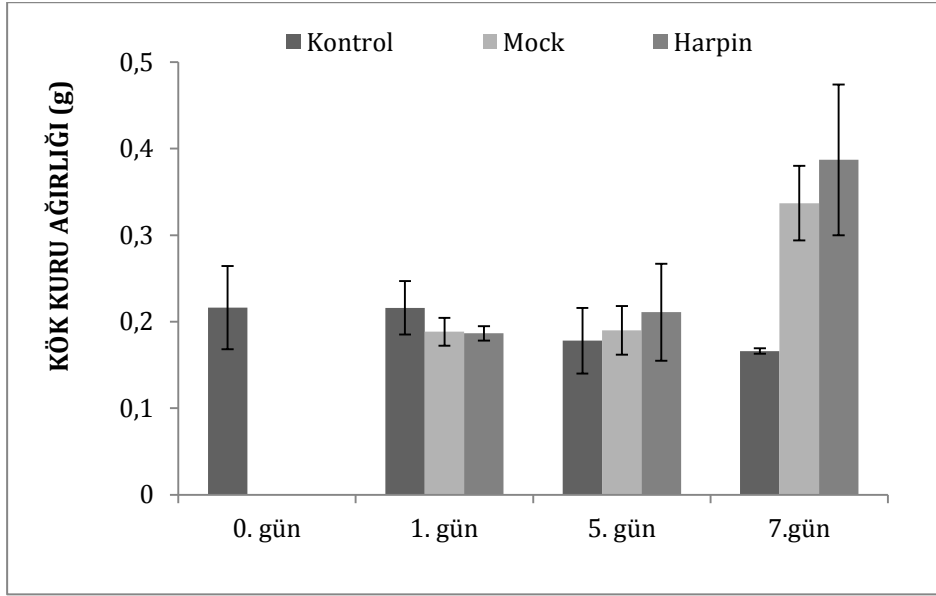
Gövde yaş ağırlığına ait veriler incelendiğinde; stres uygulamasının 1. gününde kontrol grubu ile mock grubu karşılaştırıldığında kayda değer bir değişiklik gözlenmedi ancak, harpin uygulanan grupta % 40 oranında bir azalma belirlendi. Çalışmamızda özellikle stres uygulamasının 5. ve 7. gününde mock ve harpin uygulanan gruplarda gövde yaş ağırlığında azalma belirgin azalma görüldü. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında mock ve harpin uygulanan gruplarda gövde yaş ağırlığındaki azalma 5. günde sırasıyla % 48 ve % 40, 7.günde ise % 22 ve % 34 oranlarında tespit edildi.



Şekil 3.3 Kontrol, mock, harpin uygulamasının *Nicotiana tabacum*'da gövde yaş ağırlığı üzerine etkisi.

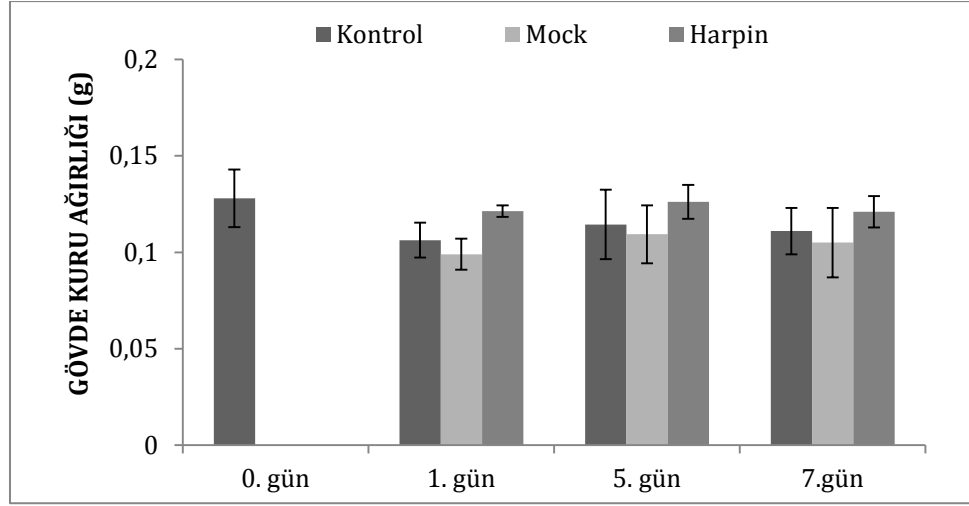
3.1.2 Kök ve Gövde Kuru Ağırlıkları

Kök ve gövde kuru ağırlık değişimlerine ait veriler şekiller 3.4 ve 3.5’de verildi. Denemenin 1. ve 5. günlerinde kontrol, mock ve harpin uygulanan grupların kök kuru ağırlığında önemli derecede bir farklılık belirlenmedi. Biyotik stres uygulamasının 7. gününde kök kuru ağırlık değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mock grubunda % 103 harpin uygulaması yapılan grupta % 133 arttı.



Şekil 3.4 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, mock, harpin uygulaması yapılan gruplarda kök kuru ağırlığındaki değişimler

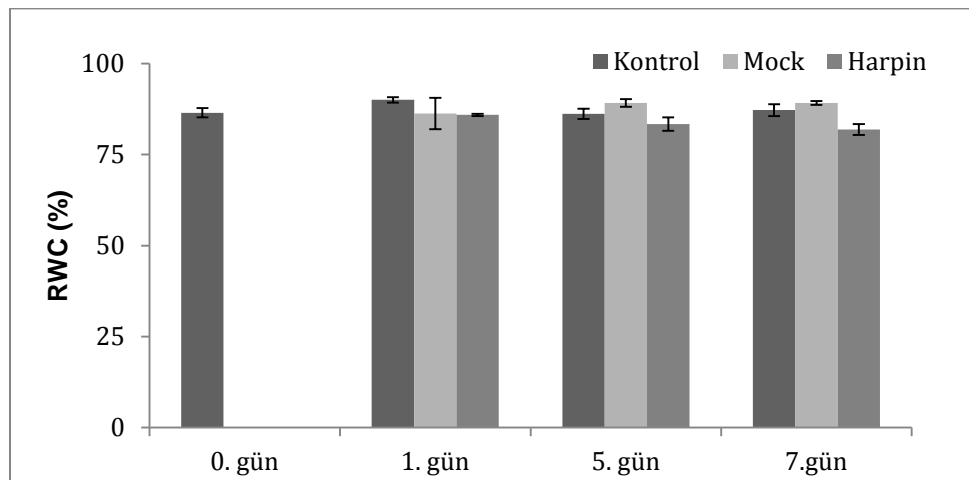
Gövde kuru ağırlık sonuçları, stres uygulamasının 1., 5. ve 7. günlerinde benzer değişimler gösterdi. Gövde kuru ağırlıkları 0. gün değeri ile karşılaştırıldığında kontrol, mock, harpin uygulanan gruplarda 1, 5 ve 7. günlerde belirgin değişim gösterdi. Mock gruplarında gövde kuru ağırlıkları 1. günde % 6,9; 5.günde % 4,4 ve 7.günde ise % 5,4 oranlarında azaldı. Harpin uygulanan grupta ise azalma oranları 1. günde % 14,2; 5. günde % 10,5 ve 7. günde ise % 9 olarak kaydedildi.



Şekil 3.5 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, mock, harpin uygulaması yapılan gruplarda gövde kuru ağırlığındaki değişimler

3.1.3 Bağlı Su İçeriği (RWC)

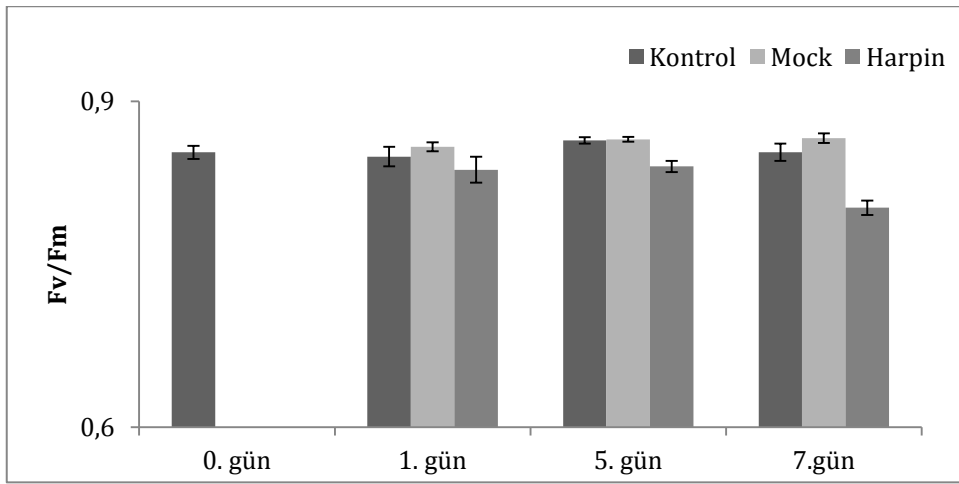
Biyotik stres uygulanan tütün bitkilerinde bağlı su içeriği değişimleri şekil 3.6’te gösterildi. Deneme süreci boyunca kontrol, mock ve harpin gruplarının bağlı su içeriği değişiminde önemli bir farklılık kaydedilmedi. Kontrol grubu ile harpin uygulaması yapılan grup karşılaştırıldığında RWC değerleri sırasıyla 1. günde % 4,5; 5.günde % 3,2 ve 7. günde % 6 düzeylerinde azalırken, mock grubunda ise 1. günde % 4 azaldı. Bununla birlikte mock gruplarında RWC kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 5.günde % 3,5 ve 7. günde ise % 2,3 oranlarında artış gösterdi.



Şekil 3.6 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, mock, harpin uygulaması yapılan gruplarda bağlı su içeriğindeki değişimler

3.1.4 Fotosentetik Verim

Fotosentetik verim bitkilerin streslerden etkilenme derecelerini gösteren önemli bir parametredir. Tütün bitkilerine uygulanan biyotik stresin fotosentetik verim üzerine etkisi belirleyebilmek için 0., 1., 5. ve 7. günlerde Fv/Fm oranlarını ölçerek, kaydedildi (Şekil 3.7). Kontrol bitkilerine göre; harpin uygulaması yapılan bitkilerde fotosentetik verim 1. günde %1,4, 5.günde % 2,7 ve 7. günde % 5,9 azalma gösterdi. Mock grubunda ise deneme süresince kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Fv/Fm değerleri istatistiksel düzeyde önemli olmayan bir artış görüldü. Bu artış 1. günde % 1, 5. günde % 0,1 ve 7. günde %1,5 düzeyide oldu.



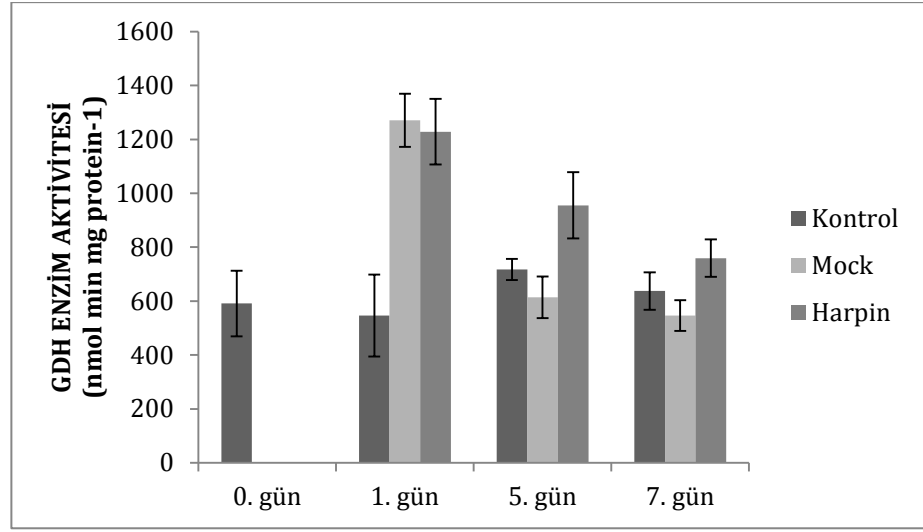
Şekil 3.7 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, mock, harpin uygulaması yapılan gruplarda fotosentetik verimdeki değişimler

3.2 Enzim Aktiviteleri

3.2.1 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesi

GABA biyosentez yolunda; α -ketoglutarattan glutamat oluşumunu katalizleyen glutamat dehidrogenaz enzim aktivitesindeki değişimler *N.tabacum* bitkilerinde kontrol, mock, harpin uygulanan gruplarında incelendi (Şekil 3.8). En yüksek GDH enzim aktivitesi stres uygulamasının 1. gününde mock ve harpin uygulanan gruplarda gözlemlendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 1. günde mock grubunda GDH enzim aktivitesi % 132; harpin uygulanan grupta ise % 125 oranında arttı. GDH aktivitesi 5. ve 7. günlerde 1.gün değerlerine göre daha düşük düzeyde belirlendi. Ancak bu değerler her iki günde de harpin uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre daha yüksek seviyede kaydedildi. Mock grubu 5.

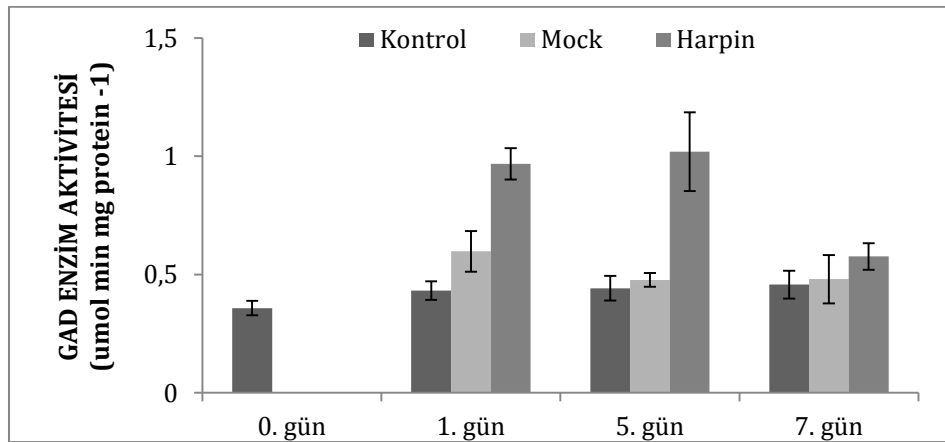
ve 7. günde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 14,42 ve % 14,3 oranında azaldı; harpin grubunda ise % 33 ve % 19 arttı.



Şekil 3.8 Kontrol, mock, harpin uygulamasının *N.tabacum* bitkilerinde GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.2.2 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesi

Çalışmamızda tütün yapraklarında, biyotik stresin 1., 5. ve 7. gününde GAD enzim aktivitesindeki değişimler de incelendi (Şekil 3.9). Harpin uygulaması ile indüklenen biyotik stresin etkisi ile 1. ve 5. günlerde GAD enzim aktivitesinde belirgin artış gözlemlendi. Enzim aktivitesi harpin uygulanan grupta kontrol grubuna göre uygulamanın 1. gününde % 124; 5. günde ise % 130 artmıştır. Mock grubundaki GAD enzim aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında özellikle 5. ve 7. günde düşük düzeyde bir artış meydana geldi; bu artışlar; 1.günde %38, 5. günde % 7,9 ve 7. günde % 5 düzeyinde kaydedildi.

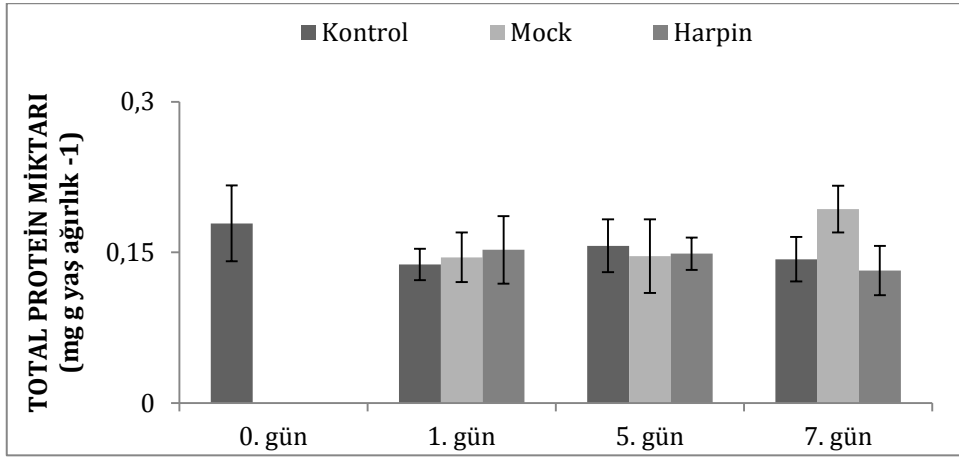


Şekil 3.9 Kontrol, mock, harpin uygulamasının *N.tabacum* bitkilerinde GAD enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.3 Diğer Biyokimyasal Parametreler

3.4.1 Total Protein Miktarları

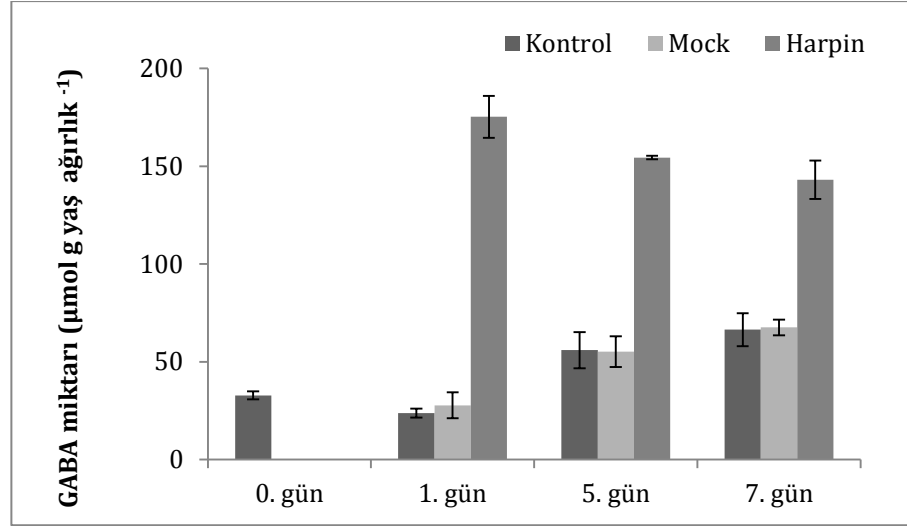
Kontrol, mock, harpin uygulaması yapılan tütün bitkilerinin yapraklarında total protein miktarları belirlendi (Şekil 3.10). Total protein miktarı 0. Gün ile karşılaştırıldığında 1., 5. ve 7. günlerde genellikle azaldı. Deneme süresince kontrol, mock ve harpin gruplarının total protein miktarları karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık kaydedilmedi.



Şekil 3.10 *N.tabacum* bitkilerinde biyotik stresin total protein içeriğine etkisi

3.4.2 GABA Miktarının Belirlenmesi

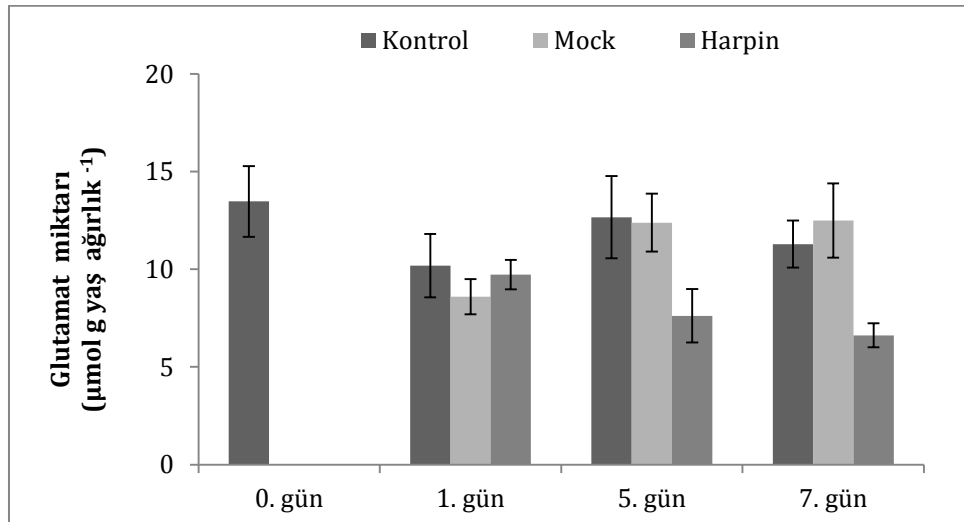
Nicotiana tabacum bitkisinde GABA miktarlarındaki değişimler kontrol, mock ve harpin uygulanan gruplarda belirlendi (Şekil 3.11). Kontrol grubu ile harpin uygulaması yapılan grup karşılaştırıldığında GABA miktarı seviyesi oldukça büyük bir farklılık göstermektedir. Harpin ile indüklenen biyotik stresin etkisiyle GABA miktarı, 1.günde 175,24 $\mu\text{mol g YA}^{-1}$ ile en yüksek düzeye ulaştı ve bu değer kontrol grubu değeri ile karşılaştırıldığında harpin uygulanan gruptaki GABA birikiminde 6 katlık bir artış olduğu gözlemlendi. Kontrol ve mock gruplarındaki GABA miktarı değişimi deneme süresi boyunca birbirine yakın seviyelerdedir. Her iki grupta da 0. günden 7. güne kadar GABA birikiminde artış görüldü. Örneğin 0. gün kontrol grubunda GABA miktarı 32,82 $\mu\text{mol g YA}^{-1}$ iken, 7. günde GABA miktarı yaklaşık 2 kat artarak, 66,45 $\mu\text{mol g YA}^{-1}$ düzeyine ulaştı. Benzer şekilde mock grubundaki GABA miktarı 1. günde 27,79 $\mu\text{mol g YA}^{-1}$ iken, 7. günde % 143 artarak 67,6 $\mu\text{mol g YA}^{-1}$ seviyesine ulaştı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 *N. tabacum* bitkilerinde biyotik stresin GABA miktarları üzerine etkisi

3.4.3 Glutamat Miktarının Belirlenmesi

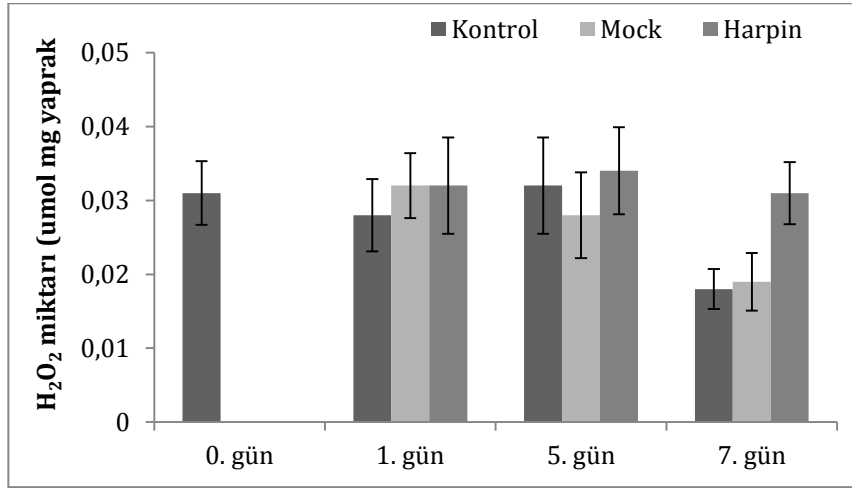
Çalışmamızda kontrol, mock ve harpin uygulanan tütün bitkilerinde glutamat miktarındaki değişimler belirlendi (Şekil 3.12). Kontrol şartları altında en yüksek Glutamat miktarı $13,47 \mu\text{mol g YA}^{-1}$ ile 0. günde gözlemlendi. Harpin uygulaması ile oluşan biyotik stresin etkisi deneme süresince glutamat miktarında azalmaya neden oldu. Özellikle 5. ve 7. günde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 39,8 ve % 70 düzeylerinde azalma meydana geldi. Mock grubunda ise kontrol grubuna göre glutamat miktarı değişimleri önemli seviyede farklılık göstermedi. 1. ve 5. günlerde sırasıyla % 15,6 ve % 2,2 azalma, 7. günde ise % 10,7 artma belirlendi ayrıca 7. günde en yüksek Glutamat miktarı $12,49 \mu\text{mol g YA}^{-1}$ ile mock grubunda gözlemlendi.



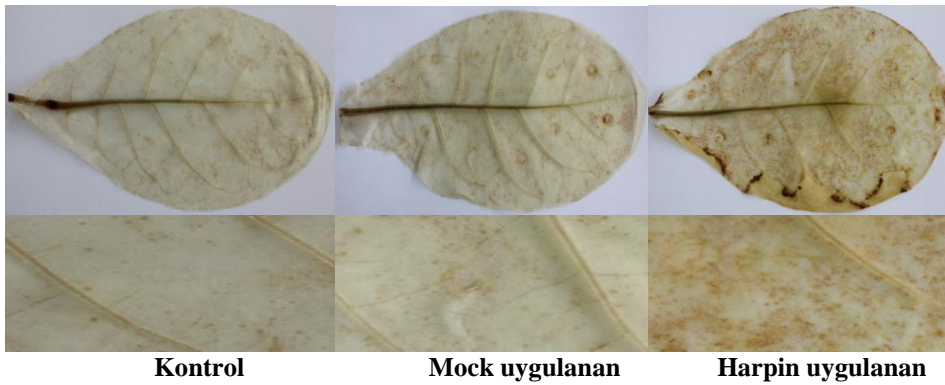
Şekil 3.12 *N. tabacum* bitkilerinde biyotik stresin Glutamat miktarları üzerine etkisi

3.4.4 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarının Belirlenmesi

Biyotik strese karşı bitkilerde savunma yanıtı olarak reaktif oksijen türleri üretilmektedir (Bolwell and Wojtaszek, 1997; Bolwell, 1999). Çalışmamızda yaprak örneklerimizde deneme süresince (0, 1., 5. ve 7. günlerde) kontrol, mock ve harpin uygulanan gruplarda DAB boyaması ile yapraklardaki H₂O₂ birikimini hem görsel olarak hem de miktar açısından belirledik. Sonuçlara ait veriler şekiller 3.13 ve 3.14'te görülmektedir. H₂O₂ miktarı, uygulamanın 1. gününde mock ve harpin uygulanan gruplarda benzer seviyelerde gözlemlendi ancak bu değerler kontrol düzeylerine göre daha yüksek seviyedeydi. H₂O₂ birikimi 5. günde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mock grubunda % 12,5 azalma, harpin uygulanan grupta ise % 6,25 artış gösterdi. Bununla birlikte deneme süresi boyunca H₂O₂ miktarındaki en belirgin değişim 7.günde gözlemlendi. H₂O₂ miktarı harpin uygulanan grupta kontrol grubuna göre % 72 oranında artış gösterirken, kontrol ve mock gruplarında aynı miktarlarda H₂O₂ birikimi kaydedildi.



Şekil 3.13 *N.tabacum* bitkilerinde biyotik stresin H₂O₂ miktarları üzerine etkisi



Şekil 3.14 *N.tabacum* bitkilerinde 7. günde kontrol, mock ve harpin uygulanan bitkilerde H₂O₂ birikiminin DAB boyama yöntemi ile belirlenmesi.

4. TARTIŞMA

Bitkiler doğada; virüsler, bakteriler, funguslar, oomycetes, nematodlar ve herbivorları içeren patojen ve zararlıların büyük çoğunluğundan etkilenmektedir (Glazebrook, 2005). Bu nedenle bitkiler, biyotik streslerin geniş çoğunluğuna adapte olmak ve yaşayabilirliğini sürdürmek için çeşitli stratejiler geliştirir (Howe and Jander, 2008). Patojen ataklarından korunmak için geliştirilen en önemli stratejilerden biri kimyasal savunma yanıtlarıdır (Levin, 1976; Swain, 1977; Wittstock and Gershenzon, 2002). Bu kimyasal toksinlerin çoğu, glukosinolatlar, alkaloidler ve fenolikler gibi bitki sekonder metabolitleridir (Schoonhoven et al., 2005). Proteinik olmayan aminoasitler de bu süreçte; azot/karbon depoları olarak, primer metabolitlerin katabolizması ve biyosentezinde ara bileşenler olarak hareket ederek önemli rol oynar (Rosenthal, 1991). GABA, dört karbonlu protein yapısına katılmayan bir aminoasittir (Baum et al., 1993; Snedden et al., 1996). GABA'nın bitkilerde, büyüme ve gelişme, pH düzenlenmesi, çevresel stres faktörlerine yanıt, böceklerle ve hastalıklara karşı direnç, azot kaynağı olarak kullanılması ve ayrıca sinyal molekülü olarak görev yaptığı bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, tuz stresi gibi çeşitli abiyotik stres koşullarında GABA miktarlarında değişimler saptanmıştır ancak biyotik stres koşullarındaki değişimler ile ilgili kısıtlı bilgi bulunmaktadır.

Çalışmamızda tütün bitkisinde, harpin ile indüklenen biyotik stres sürecinde, glutamat, GABA miktarları ve GAD (glutamat dekarboksilaz), GDH (glutamat dehidrogenaz) enzim aktivitelerindeki değişimleri inceledik. Ayrıca GABA ve oksidatif stres arasındaki etkileşimi belirlemek için deneme süresince hidrojen peroksit miktarlarındaki değişimleri de belirledik. Bununla birlikte, fizyolojik parametrelerle ilgili olarak kök gövde yaş, kuru ağırlık değerlerini, bağıl su içeriğini ve fotosentetik verimdeki değişimleri de gözlemledik. Araştırma projemizin hipotezi daha önceden belirttiğimiz gibi; GABA metabolizması ile biyotik strese verilen yanıtlar arasında bir ilişkinin bulunduğu ve bu ilişkinin dolaylı veya doğrudan H_2O_2 gibi ROT'ların birikimi ile ilgili olduğudur. Bu açıdan elde edilen sonuçları değerlendirdiğimizde, gerek glutamat, GABA miktarlarındaki değişimler gerekse GDH ve GAD aktivitelerindeki değişimler bu ilişkiyi vurgular niteliktedir. Genel olarak harpin uygulamasının erken aşamasında verilen yanıtların GABA metabolizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir, bulgularımız bu düşüncemizi destekler niteliktedir.

Harpin uygulaması yapılan gruplarda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, gövde yaş ağırlığında azalma, kök yaş ağırlığında ise artma meydana geldi. Mekanik stresin etkisini belirlediğimiz mock grubunda da benzer bir etki görülmektedir. Harpin uygulanan grupların kök kuru ağırlığında ve gövde kuru ağırlığında kontrol şartları ile karşılaştırıldığında artma, mock grubunun kök kuru ağırlığında artma, gövde kuru ağırlığında azalma tespit edildi. Pamuk bitkisinde yapılan bir çalışmada, harpin uygulamasının bitki ağırlığı üzerine önemli bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır (Bednarz et al., 2002), ancak kanola ve domates bitkisinde; harpin proteini uygulamasının bitki ağırlığını artırdığı belirlenmiştir (Bishnoi and Payyavula, 2004).

Bitkilerde patojen ve herbivor etkisi ile savunma süreçlerinin aktif hale gelmesi sonucunda yaprak dokularında fotosentetik kapasitenin azalması meydana gelir (Bilgin et al., 2010). Ayrıca oomycetes bitki patojeni olan *P.capsici*'nin biber bitkisindeki klorofil seviyesini negatif olarak etkilediği tespit edilmiştir (Aguirreolea et al., 1995). Çalışmamızda da harpin uygulanan gruplarda fotosentetik verimde azalma gözlemlendi. Bu azalma özellikler yapraklarda ki hasarın daha belirgin olduğu koşullarda yani stres uygulamasının 7. gününde daha belirgin düzeydeydi. Bitkilerin RWC, çevresel koşulların etkisi ile değişim gösteren bitkinin içinde bulunduğu ortamdaki su durumunu ortaya koyan önemli parametrelerden biridir. Çalışmamızda fotosentetik verime benzer şekilde harpin uygulaması yapılan gruplarda bağıl su içeriği sonuçlarında da azalma gözlemlenmiştir, bu değerler yaprak yaş ağırlığı değişimleri ile uyumlu görülmüştür.

Bitkilerde, abiyotik ve biyotik stresin çeşitli formlarında GABA seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Shelp et al., 1999). Ayrıca, GABA bitkilerde, bakteriyal fitopatojenlere karşı savunma sinyali olarak salgılandığını öne süren çalışmalarda bulunmaktadır (Chevrot et al., 2006). Örneğin; *Cladosporium fulvum* enfeksiyonu sırasında domates bitkisinin apoplastında GABA seviyesi artışı tespit edilmiştir (Solomon ve Oliver, 2001;2002), ve blast fungus ile enfeksiyon sırasında pirinç bitkisinde GABA shunt aktive olmaktadır (Wu et al., 2006). Bu durumlara ilave olarak, GABA, *Agrobacterium tumefaciens* de virulansı (Chevrot et al., 2006) ve böcekler tarafından indüklenen herbivor etkisini azaltabilmektedir (Bown et al., 2006). Benzer olarak çalışmamızda kontrol gruplarına göre harpin uygulanan gruplarda GABA seviyesi artmıştır. Özellikle 1.günde 6 kat artış göstermiştir. Bu bulgular, GABA'nın bitkiler ile fungus, bakteri ve böcekleri içeren diğer organizmalar arasında iletişimi düzenliyor olabileceğini göstermektedir (Shelp et al., 2006). GABA birikiminin harpin uygulanan gruplarda çok yüksek seviyede

olması, deneme süresince yüksek seviyede kalması araştırma hipotezimizi destekleyen en önemli bulgulardan biridir. Bununla birlikte abiyotik stres koşulları altındaki GABA miktarını araştırdığımız daha önceki çalışmalarımızdan (Bor et al. 2009; Akçay et al. 2012) elde ettiğimiz bulgularla karşılaştırdığımızda GABA metabolizması ve biyotik stres arasındaki etkileşimin çok daha erken dönemde aktif hale geldiğini düşünmekteyiz. Özellikle 1. gündeki yüksek düzeyler GABA'nın biyotik stres koşullarında sinyal molekülü olabileceğine işaret etmektedir. GABA yolunun biyotik stresle aktif hale geldiğinin önemli kanıtlarından birisi de mekanik etkiyi gözlemek için kullandığımız mock gruplarında GABA miktarlarındaki değişimin kontrol düzeylerinde kalmasıdır.

Patojenler veya herbivorlar tarafından oluşturulan yaralanma, donma veya ısı stresleri, hücre zarlarını tahrip ederek içeriğinin sitosole akmasına neden olabilir ayrıca protonları sitosolden vakuole veya apoplasta pompalayan ATPaz enzimlerini inhibe edebilir. Bu durumda sitosolik pH düşer ve GAD aktivitesi tetiklenir (Allan et al., 2009). *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir çalışmada GABA biyosentezi ile GAD enziminin aktivitesi ve ilgili genin ifadesi açısından belirgin bir ilişki görülmüştür (Bouche et al., 2004). Bizim çalışmamızda harpin uygulaması ile indüklenen biyotik stresin etkisiyle GAD aktivitesi kontrol grubuna göre 1. günde % 124,5 5.günde ise % 130'luk artış gösterdi. 1. gün GABA düzeyleri ile birlikte ele aldığımızda GAD enziminin aktivitesinde gözlenen bu artış GABA yolunun aktif hale geldiğinin en önemli kanıtlarından biridir. GABA'nın bitkilerdeki en önemli sentez yolu olan glutamattan GAD aktivitesi ile GABA'nın sentezlenmesi, tütün bitkisinde biyotik stres koşullarında aktif halde geldi.

Glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH), α - ketoglutarattan glutamat oluşumunu katalizler. Tütün bitkisine uzun süreli tuz stresi uygulanması sonucu GDH enzim aktivitesini azaldığı GABA birikiminin arttığı tespit edilmiştir (Akçay et al., 2012). Bizim çalışmamızda harpin ile indüklenen biyotik stres sonucu deneme süresince glutamat miktarında 1.günden 7. güne kadar azalma meydana gelmiştir. GABA metabolizmasında GDH enzim aktivitesi ile glutamat oluşumu gerçekleşir. Sonuçlarımızda, Glutamat oluşumunda özellikle harpin uygulamasının 5. ve 7. gününde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 39,8 ve % 70 azalma meydana geldi. GDH enzim aktivitesindeki azalma ile glutamat miktarındaki azalma sonuçları uyumludur.

Hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali gibi ROT'lar, patojen atağının tanınması sonrasında meydana gelir (Lamb and Dixon, 1997; Shetty et al., 2008). Patojen atağı olan bölgenin sınırlandırılması için yapraklarda özellikle H_2O_2 birikiminin artması önemli savunma yanıtlarından biridir. Biyotik stres koşullarında yapraklardaki H_2O_2 birikimini tetikleyen mekanizmalara bitkilerde çeşitlilik göstermektedir, bu yollardan bir kısmı SA ilişkili olarak rapor edilmişken poliamin oksidaz aracılı veya NADPH oksidaz aracılı süreçlerde bildirilmiştir (Zhang et al., 2007; Yoda et al. 2009) Üzüm bitkisinde yapılan çalışmada harpin uygulamasının erken oksidatif patlamayı tetiklediği belirlenmiştir (Nick and Chang, 2012). Bizim çalışmamızda harpin uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre H_2O_2 birikiminin daha yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi. H_2O_2 birikimi özellikle harpin uygulamasının 7. gününde kontrol grubuna göre belirgin düzeylerde birikim gösterdi. Bu sonuç ışığı altında çalışmamızda H_2O_2 birikimindeki artışın GABA yolu bileşenleri ile ilişkili bir değişim gösterdiğini söyleyebiliriz. Tütün bitkilerinde stresin 7. gününde yapraklarda görülen H_2O_2 birikimi, patojen etkisini sınırlandırmak için verilen yanıtlardan biridir.

5.SONUÇLAR

Çalışmamızda tütün bitkisinde harpin ile indüklenen biyotik stresinin etkisi ile GABA metabolizması arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek için GABA metabolizması bileşenlerinin değişimlerini inceledik. Harpin uygulaması ile gerçekleşen biyotik stresin etkisinin 7. günde en belirgin olduğu tespit edildi. Ayrıca gövde yaş ağırlığında, harpin uygulanan grupta azalma meydana gelirken kök yaş ağırlığında artma belirlenmiştir. Bu durum harpin'in yapraklardan köklere taşıyor olabileceğini göstermektedir. Glutamat ve GABA miktarı değişimleri ile GAD ve GDH enzim aktiviteleri birbirleri ile uyumlu değişimler göstermiştir. Bu durum GABA yolu bileşenlerinin biyotik strese verilen yanıtta etkili olduğunu göstermiştir. Hidrojen peroksit, patojen atağı sırasında erken meydana gelen reaktif oksijen türlerinden biridir. Biyotik stres uygulamasının ilk gününde hidrojen peroksit miktarındaki ve GABA'da gözlenen artış paralellik göstermektedir. Diğer GABA yolu bileşenlerine ait sonuçlarla birlikte değerlendirildiğimizde GABA'nın harpin ile indüklenen stres yanıtlarında H₂O₂ birikiminide içine alan süreci tetikleyen bir sinyal molekülü olarak görev aldığını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aguirreolea, J., Irigoyen, J., Sanchez-Díaz, M. and Salaverri, J.,** 1995, Physiological alterations in pepper during wilt induced by *Phytophthora capsici* and soil water deficit, *Plant Pathology*, 44, 587–96 pp.
- Akçay, N. Bor, M. , Karabudak, T., Özdemir F. and Türkan İ.,** 2012, Contribution of Gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress response of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants, *Journal of Plant Physiology*, 169(5), 452–458 pp.
- Akihiro, T., Koike, S., Tani, R., Tominaga, T., Watanabe, S. and Iijima, Y., et al.,** 2008, Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato, *Plant Cell Physiology*, 49, 1378 – 1389 pp .
- Alfano, J.R. and Collmer, A.,** 1997, The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death, *Journal of Bacteriology*, Vol 179, 18, 5655-5662 pp.
- Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Trenkamp, S., Bunik, V.I. and Fernie, A.R.,** 2008, Inhibition of 2-oxoglutarate dehydrogenase in potato tuber suggests the enzyme is limiting for respiration and confirms its importance in nitrogen assimilation, *Plant Physiology*, 148, 1782–1796 pp.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W., and Mock, N.M.,** 1993, Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora* elicits active oxygen production in suspension cells, 102, 1341-1344 pp.
- Barbosa, J.M., Singh, N.K., Cherry, J.H. and Locy, R.D.,** 2010, Nitrate uptake and utilization is modulated by exogenous γ -aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 443-50 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bartyzel, I., Pelczar, K. and Paszkowski, A.,** 2003, Functioning of the gamma-aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress, *Biologia Plantarum*, 47(2), 221–225 pp.
- Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M. and Fromm, H.,** 1996, Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO Journal*, 15 (12), 2988-2996 pp.
- Bednarz, C.W., Brown, S.N., Flanders, T.J., Tankersley, T.B. and Brown, S.M.,** 2002, Effects of foliar applied harpin protein on cotton lint yield, fiber quality, and crop maturity, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33, 933–945 pp.
- Belkhadir, Youssef., Subramaniam, R. and Dangl, J.L.,** 2004, Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners, *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 391-399 pp.
- Bilgin, D.D., Zavala, J.A., Zhu, J., Clough S.J., Ort, D.R. and DeLucia E.H.,** 2010, Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes, *Plant, Cell and Environment*, 33, 1597-1613 pp.
- Bishnoi, U.R. and Payyavula, R.S.,** 2004, Effect of plant activators on disease resistance and yield in tomato and conaló, In: *Fourth International Crop Science Congress*.
- Bor, M., Seckin, B., Ozgur, R., Yılmaz, O., Ozdemir, F. and Turkan, I.,** 2009, Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum L.*) *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 655–659 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bouche', N. and Fromm, H.,** 2004, GABA in plants: just a metabolite? Trends in Plant Science, 9, 110–115 pp.
- Bown, A.W., and Shelp, B.J.,** 1997, The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid, Plant Physiology, Vol 115, 1-5 pp.
- Bown, A.W., Macgregor, K.B. and Shelp, B.J.,** 2006, Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests?, Trends in Plant Science, 11, 424–427 pp.
- Bradford, M. M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254 pp.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E.,** 2000, Responses to abiotic stresses. In: Grissem W, Buchannan B, Jones R, eds. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 1158–1203 pp.
- Breitkreuz, K.E., Allan, W.L., Van Cauwenberghe, O.R., Jakobs, C., Talibi, D., Andre, B. and Shelp, B.J.,** 2003, A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency, The Journal of Biological Chemistry, 278, 41552–41556 pp.
- Busch, K.B., and Fromm, H.,** 1999, Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides, Plant Physiology, Vol. 121, pp. 589–597 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Calver, A.R., Medhurst, A.D., Robbins, M.J., Charles, K.J., Evans, M.L., Harrison, D.C., Stammers, M., Hughes, S.A., Hervieu, G., Couve, A., Moss, S.J., Middlemiss, D.N. and Pangalos, M.N.,** 2000, The expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues, *Neuroscience*, 100, 155–170 pp.
- Caplan, J.L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T.M., Czymmek, K. and Dinesh-Kumar, S.P.,** 2008, Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector, *Cell*, 132, 449–462 pp.
- Chen, Z., Tan, J., Yang, G., Miao, M., Chen, Y. and Li, T.,** 2012, Isoflavones from the roots and stems of *Nicotiana tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activities, 5, 233-235 pp.
- Cheng, X. and Nick, P.,** 2012, Defence signaling triggered by Flg22 and Harpin is integrated into a different stilbene output in vitis cells, *PLoS ONE* 7(7), e40446 pp.
- Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B. J., Ron, E. & Faure, D.,** 2006, GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*, *Proceedings of the National Academy Sciences, USA*, 103, 7460–7464 pp.
- Chuang, H.W., Harnrak, A., Chen, Y.C. and Hsu, C. M.,** 2010, A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402, 414-420 pp.
- Coleman, S. T., Fang, T. K., Rovinsky, S. A., Turano, F. J. and Moye-Rowley, W. S.,** 2001, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 244–250 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M. and Bolwell, G.P.,** 2012, The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity, *The Plant Cell*, 24, 275–287 pp.
- Dewey, R.E. and Xie, J.,** 2013, Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*, *Phytochemistry*, 94, 10-27 pp.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.R.,** 2010, Plant Immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions, *Nature Reviews Genetics*, 11, 539–548 pp.
- El-Maarouf, H., Barny, M.A., Rona, J.P., and Bouteau, F.,** 2001, Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells, *FEBS Letters*, 497, 82–84.
- Fait, A., Yellin, A. and Fromm, H.,** 2005, GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from *Arabidopsis* mutants. *FEBS letters*, 579, 415-420 pp.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., and Fernie, A.R.,** 2008, Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants, *Trends in Plant Science*, 13, 14–19 pp.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.,** 2006, Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling Networks, *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 436-442 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gechev, T.S. and Hille, J., 2005, Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death, *The Journal of Cell Biology*, 168, 17-20 pp.

Gimenez-Ibanez, S. and Solano, R., 2013, Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens, *Frontiers in Plant Science*, 4, 2-11 pp.

Glazebrook, J., Rogers, E.E. and Ausubel, F.M., 1997, Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses, *Annual Reviews Genetics*, 31:547-569 pp.

Gohre, V. and Robatzek, S., 2008, Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity, *Annual Reviews Phytopathology*, 46, 189–215 pp.

Grallath, S., Weimar, T., Meyer, A., Gumy, C., Suter-Grotemeyer, M., Neuhaus, J.M. and Rentsch, D., 2005, The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns, *Plant Physiology*, 137, 117–126 pp.

Grant, J.J. and Loake, G.J., 2000, Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance, *Plant Physiology*, 124, 21-29.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G., 2000, Response to plant pathogens. In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 1102–1157 pp.

Hogenhout, S.A., Van der Hoorn, R.A., Terauchi, R. and Kamoun, S., 2009, Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 115–22 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hovmøller, M.S., Yahyaoui, A.H., Milus, E.A. and Justesen, A.F.,** 2008, Rapid global spread of two aggressive strains of a wheat rust fungus, *Molecular Ecology*, 17, 3818–3826 pp.
- Howe, G.A. and Jander, G.,** 2008, Plant immunity to insect herbivores. *Annual Reviews Plant Biology*, 59, 41- 66 pp.
- Huang, T., Jander, G. and Vos, M.,** 2011, Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis, *Phytochemistry*, 72, 1531-1537 pp.
- Ichinosa, Y., Andi, S., Doi, R., Tanaka, R., Taguchi, F., Sasabe, M., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Yamada, T.,** 2001, Generation of hydrogen peroxide is not required for harpin-induced apoptotic cell death in tobacco BY-2 cell suspension culture, *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 771-776 pp.
- Jindrichova, B., Fodor, J., Sindelarova, M., Burketova, L. and Valentova, O.,** 2011, Role of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the interaction between a hemibiotrophic fungal pathogen, *Leptosphaeria maculans*, and oilseed rape, 72, 149-156 pp.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L.,** 2006, The plant immune system. *Nature*, 444,323–29 pp.
- Kathiresan, A., Tung, P., Chinnappa, C.C. and Reid, D. M.,** 1997, γ -Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in Sunflower, *Plant Physiology*, 11, 5, 129-135 pp.
- Kinnersley, A.M. and Turano, F.J.,** 2000, γ -Aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress, *Critical Reviews Plant Sciences*, 19, 479–509 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lamb, C. and Dixon, R.A.**, 1997, The oxidative burst in plant disease resistance, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48, 251-275 pp.
- Levin, D.A.**, 1976, The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores, Annual Review of Ecology and Systemics, 7, 121–159 pp.
- Li, X.J., Zhao, Y.Y., You, Z.Z., Dong, H.S. and Zhang, C.L.**, 2014, The Hpa1harpin needs nitroxyl terminus to promote vegetative growth and leaf photosynthesis in *Arabidopsis*, Journal of Bioscience, 39 (in press)
- Maldonado- Calderon, M.T., Sepulveda- Garcia, E. and Rocha- Sosa, M.**, 2012, Characterization of novel F-box proteins in plants induced by biotic and abiotic stress, Plant Science, 185-186, 208-217 pp.
- Masclaux-Daubresse, C., Valadier, M.H., Carrayol, E., Reisdorf-Cren, M and Hirel, B.**, 2002, Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves, Plant Cell Environ, 25, 1451–1462 pp.
- McIntosh, R.A. and Pretorius, Z.A.**, 2011, Borlaug Global Rust Initiative provides momentum for wheat rust research, Euphytica, 179, 1–2 pp.
- Menassa, R., Nguyen, V., Jevnikar, A. and Brandle, J.**, 2001, A self-contained system for the field production of plant recombinant interleukin-10. Mol Breeding, 8, 177–85 pp.
- Meyer, A., Eskandari, S., Grallath, S. and Renrtsch, D.**, 2006, AtGAT1, a high affinity transporter for gaminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*, The Journal of Biological Chemistry, 281, 7197–7204 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Michaeli, S., Fait, A., Lagor, K., Nunes-Nesi, A., Grillich, N., Yellin, A., Bar, D., Khan, M., Fernie, A.R., Turano, F.J. and Fromm, H.,** 2011, A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. *Plant Journal*, 67, 485–498 pp.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D. and Hancock, J.T.,** 2002, Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plant, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1237-1247 pp.
- Palva, T.K., Holmstrom, K.O., Heino, P. and Palva, E.T.,** 1993, Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6, 190-96 pp.
- Peng, J.L., Dong, H.S., Dong, H.P., Delaney, T.P., Bonasera, J.M., and Beer, S.V.,** 2003, Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the NDR1 and EDS1 genes, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 317-326 pp.
- Preston, G., Huang, H.C., He, S.Y. and Collmer, A.,** 1995, The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *glycinea* and *tomato* are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 717–732 pp.
- Pretorius, Z.A., Singh, R.P., Naari, P.O., Payne, T.S. and Wagoire, W.W.,** 2000, Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene Sr31 in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda, *Plant Disease*, 84, 203 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couee, I. and Gouesbet, G.,** 2009, Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* ana plantles, *BMC Plant Biology*, 9, 28 p.
- Renault, H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A. and Deleu, C.,** 2010, The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance, *BMC Plant Biology*, 10(1), 20 p.
- Rivas, S.,** 2012, Nuclear dynamics during plant innate immunity, *Plant Physiology*, 158, 87-94 pp.
- Rosenthal, G.A.,** 1991, Nonprotein amino acids as protective allelochemicals. In: Rosenthal, G.A., Berenbaum, M. (Eds.), *Herbivores, Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, vol. 1. Academic Press, San Diego, 27–30 pp.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. and Shen, Q.J.,** 2010, WRKY transkription factors, *Trends in Plant Science*, 15, 247-258 pp.
- Schneider, D. J., and Collmer, A.,** 2010, Studying plant-pathogen interactions in the genomics era: beyond molecular Koch's postulates to systems biology, *Annual Reviews Phytopathology*, 48, 457-479 pp.
- Schoonhover, L.M., Van Loon, J.J.A. and Dicke, M.,** 2005, *Insect-Plant Biology*, Ed 2. Oxford University Press, Oxford.
- Shao, M., Wang, J., Dean, R.A., Lin, Y., Gao, X. and Hu, S.,** 2008, Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*, *Plant Biotechnology Journal*, 6, 73–81 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shelp, B.J., Mullen, R.T. and Waller, J.C.,** 2012b, Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions, *Trends Plant Science*, 17, 57–9 pp.
- Shelp, B.J., Bown, A.W. and McLean, M.D.,** 1999, Metabolism and functions of gamma aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4, 446–452 pp.
- Shelp, B.J., Bown, A.W. and Faure, D.,** 2006, Extracellular gamma-aminobutyrate mediates communication between plants and other organisms, *Plant Physiology*, 142, 1350–1352.
- Shelp, B.J., Allan, W.L. and Faure, D.,** 2009, Role of γ -aminobutyrate and γ -hydroxybutyrate in plant communication, In: *Plant-Environment Interactions, Signaling and Communication in Plants*, 73-84 pp.
- Shetty, N.P., Jørgensen, H.J.L., Jensen, J.D., Collinge, D.B. and Shetty, H.S.,** 2008, Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens, *European Journal of Plant Pathology*, 121, 267–280 pp.
- Singh, K.B., Foley, R.C. and Onate-Sanchez, L.,** 2002, Transkription factors in plant defense and stress responses, *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 430-436 pp.
- Smart, R.E. and Bingham, G.E.,** 1974, Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, 53, 258-260 pp.
- Snedden, W.A. and Fromm, H.,** 1999, Regulation of the gamma-aminobutyrate-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium–calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress. In *Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization* (Lerner, H.R., ed.), 549–574 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Snedden, W.A., Koutsia, N., Baum, G. and Fromm, H.,** 1996, Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 4148-4153 pp.
- Snedden, W.A., and Fromm, H Solomon, P.S. and Oliver, R.P.,** 2001, The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*, *Planta*, 213, 241–249 pp.
- Solomon, P.S. and Oliver, R.P.,** 2002, Evidence that gamma-aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato, *Planta*, 214, 414–420 pp.
- Studart-Guimaraes, A., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B. and Fernie, A. R.,** 2007, Reduced expression of succinyl-CoA ligase can be compensated for by up regulation of the γ -aminobutyrate shunt in illuminated leaves, *Plant Physiology*, 145, 626–639 pp.
- Swain, T.,** 1977, Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology*, 28, 479 pp.
- Sweetlove, L.J., Beard, K.M.F., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. and Ratcliffe, R.G.,** 2010, Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle, *Trends in Plant Science*, Vol.15, No.8.
- Thordal-Christensen, H.,** 2003, Fresh insights into processes of nonhost resistance, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 351–357 pp.
- Toth, I.K. and Birch, P.R.,** 2005, Rotting softly and stealthily. *Current Opinion Plant Biology*, 8, 424–29 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Toth, I.K., Pritchard, L. and Birch, P.R.**, 2006, Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. *Annual Reviews Phytopathology*, 44, 305–36 pp.
- Van Cauwenberghe, O.R., Makhmoudova, A., McLean, M., Clark, S.M. and Shelp, B.J.**, 2002, Plant pyruvate-dependent gamma-aminobutyrate transaminase: identification of an Arabidopsis cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Botany*, 80, 933–941 pp.
- Verhage, A., Van-Wees, S.C.M. and Pieterse, C.M.J.**, 2010, Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?, *Plant Physiology*, 154, 536-540 pp.
- Wang, W.X., Vinocur, B. and Altman, A.**, 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, *Planta*, 218, 1–14 pp.
- Wang, C., Fan, L., Gao, H., Wu, X., Li, J., Lv, G. and Gong, B.**, 2014, Polyamine biosynthesis and degradation are modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in root-zone hypoxia-stressed melon roots, *Plant Physiology and Biochemistry*, xxx, 1-10 pp.
- Wassenaar, T.M. and Gaastra, W.**, 2001, Bacterial virulence: Can we draw the line? *FEMS Microbiology Letters*, 201, 1–7 pp.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. and Beer, S.V.**, 1992a, Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*, *Science*, 257, 85-88 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wittstock, U. and Gershenzon, J.,** 2002, Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens, *Current Opinion Plant Biology*, 5, 300–307 pp.
- Wu, C., Zhou, S., Zhang, Q., Zhao, W. and Peng, Y.,** 2006, Molecular cloning and differential expression of a gamma-aminobutyrate transaminase gene, OsGABA-T, in rice (*Oryza sativa*) leaves infected with blast fungus, *Journal of Plant Research*, 119, 663–669 pp.
- Yang, R., Guo, Q. and Gu, Z.,** 2013, GABA shunt and polyamine degradation pathway on γ -aminobutyric acid accumulation in germinating fava bean (*Vicia faba* L.) under hypoxia, *Food Chemistry*, 136, 152-159 pp.
- Yoda, H., Fujimura, K., Takahashi, H., Uchimiya, I.M.H. and Sano, H.,** 2009, Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology*, 70(1/2), 103-112 pp.
- Zhang, S.J. and Jackson, M.B.,** 1993, GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings, *Science*, 259, 531-534 pp.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X. and Zhou, J.M.,** 2007, A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants, *Cell Host Microbe*, 1, 175-185 pp.
- Zhang, L., Xiao, S., Li, W., Feng, W., Li, J., Wu, Z., Gao, X., Liu, F. and Shao, M.,** 2011, Overexpression of a harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 62, 4229-4238 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhou, J.M. and Chai, J., 2008, Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses, *Current Opinion Microbiology*, 11, 179–85.

ÖZGEÇMİŞ

Gizem DİMLİOĞLU, 16 Temmuz 1988 yılında İzmir’de doğmuştur. 2005 yılında İzmir İnönü Lisesini bitirmiştir. Lisans eğitimini, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonundan 2011 yılında mezun olarak tamamlamıştır. Lisansüstü eğitimine 2011 yılında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doç. Dr. Melike BOR danışmanlığında başlamıştır.