

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**

**FARKLI FASULYE ÇEŞİTLERİNİN HALE YANIKLIĞI ETMENİ
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*'NİN ÇEŞİTLİ İRKLARINA KARŞI
TEPKİLERİ VE DAYANIKLI ÇEŞİTLERDEKİ DAYANIKLILIK
MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**

720732

ADEM BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTAKYA

ARALIK-2002

Mustafa Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Yrd. Doç. Dr. Soner SOYLU danışmanlığında, İ. Adem BOZKURT tarafından hazırlanan bu çalışma 18/12/2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Bitki koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Soner SOYLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Şener KURT

Üye : Yrd. Doç. Dr. Yeşim AYSAN

İmza
İmza
İmza

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Kod No : 112

İmza
18/12/2002
Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Mustafa KARLANKIRAN

Bu çalışma M.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca Desteklenmiştir.

Proje No:01 M 0202

Not : Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
ÖNSÖZ.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Kültür Koşulları ve Stok Kültürlerin Saklanması.....	15
3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri.....	15
3.2.1. King's B Ortamı.....	15
3.2.2. Luria Bertani Ortamı.....	15
3.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Patojenisite Testleri.....	16
3.3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	16
3.3.2. Fasulye Kapsüllerinin İnokulasyonu.....	17
3.3.3. Kotiledon Yaprakların İnokulasyonu.....	17
3.4. Fitoaleksinin İzolasyonu.....	18
3.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	18
3.4.2. İnokule Edilen Bitki Dokularında Biriken Fitoaleksinin Miktarının Belirlenmesi.....	19
3.4.3. Fitoaleksinlerin antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi (Biyoeftinlik).....	20
3.5. Fasulye- <i>P. s. pv. phaseolicola</i> Arasında Oluşan Reaksiyonların Işık Mikroskopunda İncelenmesi.....	20
3.6. Bitki Hücre Duvarlarında Gözlenen Dayanıklılık Mekanizmalarının Histokimyasal Boyamalar İle Belirlenmesi.....	21
3.6.1. Lignin İçin Boyama.....	21
3.6.2. Kalloz İçin Boyama.....	21
3.6.3. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) İçin Boyama.....	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	22
4.1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın Farklı Irklarıyla Farklı Fasulye Çeşitleri Arasında Oluşan İnteraksiyonların Belirlenmesi.....	22
4.1.1. Uyumlu İlişki.....	24

4.1.2. Kısmi Uyumsuz İlişki.....	26
4.1.3. Uyumsuz İlişki.....	26
4.2. Bakteriyel Çoğalma.....	28
4.3. Fasulye Bitkisinin Hale Yanıklığı Etmeni (<i>P. s. pv. phaseolicola</i>)'ne Karşı Gösterdiği Reaksiyonların Işık Mikroskobu Altında İncelenmesi.....	29
4.3.1. Uyumlu ilişki.....	29
4.3.2. Kısmi uyumsuz ilişki.....	29
4.3.3. Uyumsuz ilişki.....	29
4.4. Fasulye Çeşitlerinde <i>P. s. pv. phaseolicola</i> ile İnokulasyonu Takiben Oluşan Reaksiyonların Histokimyasal Boyamalarla Belirlenmesi.....	31
4.4.1. Lignin.....	31
4.4.1.1. Uyumlu İlişki.....	31
4.4.1.2. Kısmi Uyumsuz İlişki.....	31
4.4.1.3. Uyumsuz İlişki.....	32
4.4.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	36
4.4.2.1. Uyumlu İlişki.....	36
4.4.2.2. Kısmi Uyumsuz İlişki.....	36
4.4.2.3. Uyumsuz İlişki.....	36
4.5. Kalloz.....	41
4.6. Fitoaleksin Birikimi.....	42
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	53

**FARKLI FASULYE ÇEŞİTLERİNİN HALE YANIKLIĞI ETMENİ
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*' (Burkh.) Dows.'NİN ÇEŞİTLİ
IRKLARINA KARŞI TEPKİLERİ VE DAYANIKLI ÇEŞİTLERDEKİ
DAYANIKLILIK MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**

Bu çalışmada farklı fasulye çeşitlerinin fasulye hale yanıklığı etmeni *P. s.* pv. *phaseolicola*'nın farklı ırklarına karşı göstermiş olduğu reaksiyonlar, bitkilerin kapsül (meyve) ve kotiledon yaprakları üzerinde belirlenmiştir. Fasulye çeşitleri arasında Roma-II, Efequen ve Cilena'nın 1. ırk dışındaki tüm bakteri ırklarına karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Efequen ve Cilena çeşitleri 1, Gina, Yunus-90 ve Magnum çeşitleri 2, Şehirali-90, Karacaşehir-90 ve Şekerli çeşitleri 3, Ayşe Kadın ve Göynük-98 çeşitleri ise 4 bakteri ırkına karşı dayanıklılık gösterirken Roma-II, Yunus-90, Göynük-98 ve Şekerli çeşitleri 1, Şehirali-90 ve Ayşe kadın çeşitleri 2, Karacaşehir-90 çeşiti 3 bakteri ırkına karşı orta derecede dayanıklılık göstermiştir. Bakterinin 6, 8 ve 9. ırklarının testlenen tüm fasulye çeşitlerinde virulent olduğu tespit edilmiştir.

Bitki kapsüllerinde gözlenen uyumlu ilişki, hızlı bakteriyel çoğalma ve reaksiyon noktalarında ıslaklık oluşumu ile karakterize edilmiştir. Yapraklarda ise infeksiyonun ilk dönemlerinde ortaya çıkan ıslaklık belirtileri, ilerleyen dönemlerde nekrotik hale dönüşerek, bu alanların etrafı klorotik hale ile çevrilmiştir. Dayanıklı bitki kapsüllerinde ortaya çıkan uyumsuz ilişki ise oldukça sınırlı bakteriyel gelişme ve hızlı doku bozulmaları ile ifade edilmiştir. Uyumlu ilişkide gözlenenin aksine inokulasyon noktalarında kahverengi lezyonlar meydana gelmiştir. Bu lezyonlar zamanla tamamen kurumuş, infeksiyonun ileri aşamasında ise çökmüştür. İnfiltrasyonun yapıldığı yapraklarda bakteriler, aşırı duyarlılık tepkimesi (hypersensitive reaction, HR)'nin göstergesi olan kuruma ve parlamalara (camlaşma) sebep olmuştur.

Uyumlu ve uyumsuz ilişkilerin ortaya çıktığı yapraklarda gözlenen reaksiyonlar ve dayanıklılıkta rol oynayan mekanizmalar (lignin, kalloz ve hidrojen peroksit (H_2O_2)) histokimyasal çalışmalarla saptanmıştır. Uyumlu ilişkide infeksiyonun ilk dönemlerinde bitki hücrelerinin yapısında belirgin bir değişiklik gözlenmezken infeksiyonun ileri dönemlerinde hücrelerde şiddetli yapısal bozulmalar belirlenmiştir.

Uyumsuz ilişkinin gözlendiği yapraklardaki reaksiyon noktalarında bulunan hücrelerin duvarlarında yoğun ve lokal bir şekilde lignin, kalloz, ve H_2O_2 birikiminin ortaya çıktığı yapısal değişiklikler gözlenmiştir. Dayanıklı bitkilerin kapsüllerinde ortaya çıkan fitoaleksinin (phaseollin) birikiminin, duyarlı bitkilerin kapsüllerinde ortaya çıkandan daha yüksek düzeyde bulunduğu belirlenmiştir. Kısmi uyumsuzluk gösteren çeşitlerde ise bakteriyel çoğalma uyumlu ilişkiye oranla daha yavaş olup bu hücrelerde dayanıklılık reaksiyonları infeksiyonun geç dönemlerinde ortaya çıkmıştır.

2002, 61 sayfa

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Phaseolus vulgaris*, lignin, kalloz, H_2O_2 , fitoaleksinin, aşırı duyarlılık tepkimesi.

ABSTRACT
RESPONSE OF DIFFERENT BEAN CULTIVARS AGAINST DIFFERENT RACES OF *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkh.) Dows. CAUSAL AGENT OF HALO BLIGHT AND DETERMINATION OF RESISTANCE MECHANISM ON RESISTANT BEAN CULTIVARS

In this study, plant responses to races of the halo blight pathogen *P. s. pv. phaseolicola* were determined on pods and cotyledon leaves of different bean cultivars. Among the bean cultivars tested; Roma-II, Efequen and Cilena cultivars found to susceptible against all bacterial races except race 1. Efequen and Cilena cultivars were resistant to 1 race; Gina, Yunus-90 and Magnum cultivars were resistant to 2 races; Şehirali-90, Karacaşehir-90 and Şekerli cultivars were resistant 3 races; Ayşe Kadın and Göynük-98 cultivars were resistant 4 different bacterial races. Roma-II, Yunus-90, Göynük-98 and Şekerli cultivars were found to be moderately resistant to 2 races; Karacaşehir-90, was moderately resistant to 3 bacterial races. All bean cultivars were found to be susceptible to races 6, 8 and 9.

Compatible interactions on pods from susceptible plant were characterised as rapid bacterial growth and water soaked lesion at inoculated sites. In leaves, compatible interactions were characterised development of water soaked lesion accompanied by delayed tissue collapse during the early stage of the infection. By time, infiltrated area became necrotic and surrounded by chlorotic halo. Incompatible interactions on pods from resistant plant were expressed by restricted bacterial multiplication and rapid tissue collapse. In contrast to susceptible interactions, brown lesion was developed around the inoculation sites. Brown tissue progressively dessicated and collapsed by time. Bacteria caused rapid glazing, characteristic of HR, within the infiltrated regions of leaves of resistant plant.

Reactions observed during compatible (susceptibility) and incompatible interactions (resistance) and mechanisms involved in diseases resistance, such as accumulation of lignin, callose and hydrogen peroxide (H_2O_2), were determined by histochemical studies. During compatible interaction, no obvious alterations to structure of cells, was observed in the early stage of the infection. By time, however, severe changes in cell structure were observed during the late stage of the infection. Significant and striking cell wall alterations such as accumulation of callose, lignin and H_2O_2 were determined at reactions sites in resistant plant leaves. Accumulation of phytoalexin (phaseollin), in pods were considerably higher in incompatible interactions than compatible interactions.

Infection development on moderately resistant cultivars was expressed as reduced bacterial growth in which, resistance reactions occurred later stage of the infection.

2002, 61 pages

Key Words: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Phaseolus vulgaris*, lignin, callose, H_2O_2 , phytoalexin, hypersensitive reaction.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada farklı fasulye çeşitleri ile *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın ırkları arasındaki konukçu-patojen ilişkileri yaprak ve kapsül inokulasyon teknikleri kullanılarak makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Uyumsuz ilişkinin gözlemlendiği dayanıklı bitkilerin yaprak hücrelerinde biriken kalloz, lignin ve H₂O₂ histokimyasal boyamalarla belirlenmiştir. Fitoaleksin çalışmalarında ise bakterilerin farklı ırkları ile inokule edilen kapsüller kullanılmıştır.

Laboratuvar çalışmaları M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji laboratuvarlarında yapılmıştır.

Tez konumun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen, değerli fikir ve katkılarıyla çalışmalarımı yönlendiren sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Soner SOYLU'ya (Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü) ve yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı Ar. Gör. Yusuf Ziya GÜZEY'e (Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü) teşekkür ederim.

İş ve özel hayatımda gerek maddi gerekse manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürler...

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AOS	Aktif Oksijen Türleri (Active Oxygen Species)
<i>avr</i>	Avirülenslik Geni
EPS	Ekstraselüler Polisakkaritler
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HR	Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction)
HRGP	Hidroksi Prolince Zengin Glukoproteinler
KB	King's B Besi Yeri
pv	Patovar
PR	Patojenisite ile İlgili Proteinler
SAR	Sistemik Kazandırılmış Dayanıklılık (Systemic Acquired Resistance)
TLC	İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatograph)
UV	Ultraviyole

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırkları.....	16
Çizelge 3.2. Fasulye çeşitleri ve kullanım amaçları.....	17
Çizelge 3.3. Fasulyede fitoaleksinin birikiminin karakteristik değerleri.....	18
Çizelge 4.1. Farklı bakteri ırkları ile inokule edilen fasulye çeşitlerine ait kapsüller üzerinde gözlenen konukçu reaksiyonları.....	23
Çizelge 4.2. İnokule edilen kapsüllerde H ₂ O ₂ birikim oranları.....	37



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1	UV ışık altında işaretlenen ve steril bistüri ile kazınan phaseollin bantları.....	19
Şekil 4.1.	Kapsül inokulasyonlarının 4. gününde oluşan reaksiyonlar.....	22
Şekil 4.2.	Kapsül inokulasyonları.....	24
Şekil 4.3.	İnokulasyonun 4. (A) ve 7. (B) günlerinde <i>P. s. pv. phaseolicola</i> 'nın farklı ırklarının fasulye çeşitleri üzerinde göstermiş olduğu reaksiyonlar.....	25
Şekil 4.4.	Yaprak inokulasyonları.....	27
Şekil 4.5.	Farklı <i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırkları ile inokule edilmiş kotiledon yapraklarda zamana bağlı populasyon gelişimi.....	28
Şekil 4.6.	Yaprak inokulasyonlarından iki gün sonra farklı düzeylerde dayanıklılığın gözlemlendiği yaprak hücrelerinde oluşan reaksiyonlar.....	30
Şekil 4.7.	Uyumlu ilişkinin görüldüğü bitki hücrelerinde lignin birikimi ve boyama.....	33
Şekil 4.8.	Kısmi uyumsuz ilişkinin görüldüğü bitki hücrelerinde lignin birikimi ve boyama.....	34
Şekil 4.9.	Uyumsuz ilişkinin görüldüğü bitki hücrelerinde lignin birikimi ve boyama....	35
Şekil 4.10.	Uyumlu ilişkinin görüldüğü bitki hücrelerinde H ₂ O ₂ birikimi ve boyama.....	38
Şekil 4.11.	Kısmi uyumsuz ilişkinin görüldüğü bitki hücrelerinde H ₂ O ₂ birikimi ve boyama.....	39
Şekil 4.12.	Uyumsuz ilişkinin görüldüğü bitki hücrelerinde H ₂ O ₂ birikimi ve boyama.....	40
Şekil 4.13.	Uyumsuz ilişkinin görüldüğü bitki hücrelerinde kalloz birikimi.....	41
Şekil 4.14.	Pph'nın farklı ırkları ile inokule edilen Şehirali-90 fasulye çeşidinde fitoaleksinin birikimi.....	42
Şekil 4.15.	TLC plakaları üzerinde oluşan phaseollin bantlarının UV ışık altında görünümü.....	43

1.GİRİŞ

Baklagiller toprak koşullarına sağladığı fiziksel, kimyasal ve biyolojik iyileşmelerle ekim nöbetinde kendilerinden sonra gelen kültür bitkilerine daha uygun gelişme olanakları sağlamaktadır. Bu familyada yer alan en önemli bitkilerden biriside fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)'dir. Bitkisel protein ve çeşitli vitaminler bakımından oldukça zengin olan fasulye; taze, konserve ve kuru olarak dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de en fazla tüketilen sebzeler arasındadır (GÜNDÜZ, 2000). Türkiye toplam baklagil üretimi 2000 yılı verilerine göre 660.000 ton iken bunun 544.000 tonunu fasulye oluşturmaktadır. Hatay ilinde toplam 44.899 tonluk baklagil üretiminin 35.141 tonunu yine fasulye üretimi oluşturmaktadır (ANONİM, 2000). Ülkemiz ekonomisi için önemli bir baklagil bitkisi olan fasulye üretimi birçok bakteriyel, fungal ve viral patojenler tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir.

Fasulye üretimini ve verimi olumsuz yönde etkileyen önemli bakteriyel hastalıklardan birisi de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın neden olduğu fasulye hale yanıklığıdır. Etmen ılıman iklim bölgelerinde ve inokulumun fazla olduğu yerlerde önemli zararlar meydana getirmektedir.

Bakteri kışı tohum üzerinde ve topraktaki bitki artıkları üzerinde geçirmektedir. Bu tohumlar ve bunlardan yetiştirilen fideler primer inokulum kaynağıdır. Sekonder infeksiyonlar ise rüzgar, yağmur, böcekler, kullanılan alet ve ekipmanlar ile bakterinin infekteli bitkilerden sağlıklı bitkilere taşınması ile gerçekleşmektedir. Patojen bitkiye stoma ve hidatot gibi doğal açıklıklardan veya yaralardan giriş yapmaktadır. Bitkiye giriş için yapraklar üzerinde ince bir su filminin bulunması gerekmektedir.

Hastalığın en tipik simptomu ilk dönemlerde yaprak üst kısmında klorotik lekelerin meydana gelmesi ve ileri dönemlerde bu lekelerin etrafında sarı renkli bir hale oluşumudur. Hale oluşumuna bakteri tarafından üretilen ve bir fitotoksin olan phaseolotoxin neden olmaktadır. İnfekteli yaprakların alt tarafında ise suyla ıslatılmış gibi ıslaklık lezyonları oluşmaktadır. Kapsüller üzerinde de benzer klorotik lekeler oluşmaktadır fakat kapsüllerde hale oluşmamaktadır. Yoğun infeksiyonlarda bu lekelerin ortasında bakteriyel eksudat oluşmaktadır. Bu eksudat oluşumu da hastalığın sekonder yayılmasında önemlidir. Patojen cüce ve çalı fasulyelerde önemli zararlar oluşturmaktadır. Kuzey Amerika'da birçok çeşitin bulunduğu bölgelerdeki bazı

kültürlerin hale yanıklığına karşı dayanıklı olduğu saptanmıştır. Avrupa'daki çeşitler ise çok duyarlı olup bu bölgedeki çalı fasulyelerinde önemli zararlara neden olmuştur. %0.4 oranında bir primer infeksiyondan %34 kapsül infeksiyonu ve %12.5 ürün zararı, %2.6 oranında bir primer infeksiyon kaynağı bulunduğunda ise %62,5 kapsül infeksiyonu ve %43 ürün zararı oluştuğu rapor edilmiştir (KEYWORTH, 1969; SMITH, 1986'dan).

Ülkemizde 1988-1991 yılları arasında fasulye üretimi yapılan 24 farklı bölgeden toplanan 293 fasulye tohumu test edilerek bakteriyel hastalık etmenleri ile bulaşıklılığı test edilmiştir. Test edilen tohumlardan 11 tanesinin *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicaola*'nın 1 nolu ırkı ile, 24 tohumun ise etmenin 2 nolu ırkı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (BENLİOĞLU ve ark., 1994).

Hastalıkla mücadelede hastalıktan ari tohum kullanımı ve dayanıklı çeşit yetiştirilmesi önemlidir. Tohumların streptomycin veya kasugamycin ile muamelesi (TAYLOR ve DUDLEY,1977; SMITH, 1986'dan) veya kuru sıcak uygulaması (BELLETTI VETAMIETTI, 1982; SMITH, 1986'dan) iyi sonuç vermektedir fakat tohum kökenli inokulum kontrolü için her zaman yeterli değildir .

Mikroorganizmaların konukçu dizimleri genellikle çok sınırlıdır ve çoğu zaman tek bir konukçu türüne özelleşmiştir. Normal koşullarda bitkiler çevrelerindeki mikroorganizmaların çoğuna karşı dayanıklıdır. Böylece bitkilerin çoğu mikrobiyal saldırılara karşı doğal bir dayanıklılığa sahiptir. Konukçu olmama (non-host) şeklindeki dayanıklılık ya parazitin bitki tarafından tanınmaması ya da bitkide bulunan dayanıklılık mekanizmalarının bir sonucudur. Buna karşın mikroorganizmaların çok azı bitkiler üzerinde kolonize olarak hastalık oluşturabilmekte olup bu durum uyumlu ilişki olarak ifade edilmektedir. Buna karşın tek bir patojene karşı duyarlılıkta bile önemli ürün zararları ortaya çıkmaktadır. Tek bir bitki hastalığının potansiyel etkisi, patates mildiyösü hastalığı etmeni *Phytophthora infestans*'ın epidemik olarak yayılmasında açık bir şekilde görülmüştür. Etmen birçok Avrupa ülkesinde yetiştirilen patateslerin yok olmasına neden olmuş ve 1846'da İrlanda'da patates kıtlığı meydana gelmiştir (PRYOR, 1987).

Bitki patojeni bakterilerin *Pseudomonas solanacearum* ve *Erwinia amylovora* gibi bazı üyeleri geniş bir konukçu dizilimine sahip olup, bu bakterilerde bazı konukçulara karşı bildirilen türler içerisinde kesin bir farklılaşma bulunmamaktadır.

Fakat bitki patojeni bakterilerin çoğu konukçu dizilimi (bitki grubu) temel alınarak pathovarlar (pv.) içerisinde sınıflandırılmıştır.

Konukçu dizilimi bir konukçu ile sınırlanmış olmayabilir ve yakından ilişkili konukçuların bir dizilimi mevcut pathovarlara karşı duyarlı olabilir. Örneğin; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* domates bitkisi dışında Crusiferae familyasından birçok bitkiyi infekte edebilmektedir. Fakat asıl ekonomik zararını domateslerde bakteriyel leke hastalığının etmeni olarak yapmaktadır (HENDSON ve ark., 1992).

Bitki patojenleri genellikle farklı virülens fonksiyonlara sahiptirler ve bu fonksiyonlar onların konukçu bitkide kolonize olma yeteneklerini artırır (SALMOND, 1994; SCHAFER, 1994). Virülent patojenik bakteriler enzim üretimi, toksinler ve ekstraselüler polisakkaritler (EPS) gibi bazı mekanizmalara sahiptir ve bu mekanizmalar ile bitki hücrelerini değiştirerek veya zarar vererek beslenip çoğalabilmeleri için gerekli optimal koşulları sağlarlar.

Patojenlerin bitkileri bu şekilde istila edebilmelerine karşın bitkilerde patojenlere karşı bazı dayanıklılık mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkilerin patojenlere karşı kendilerini hem pasif hem de aktif olarak savundukları bilinmektedir. Savunma sisteminin tabiatına göre dayanıklılık faktörleri önceden var olan (pasif veya pre-formed) ve infeksiyonun teşvik ettiği (active veya induced) dayanıklılık olarak iki gruba ayrılırlar.

Önceden var olan dayanıklılıkta bitkiye ait morfolojik ve kimyasal özellikler önemli rol oynamaktadır. Bu şekildeki dayanıklılıkta kutikula tabakasının ince veya kalın olması, bitki yüzeyinde mumsu bir tabakanın olması, bitki yüzeyinin tüylü olması stoma sayısı gibi morfolojik özellikler önemlidir. Bunların dışında bitkide önceden varolan kimyasal maddelerin antimikrobiyal etkilerinin de dayanıklılıkta rol oynadığı bilinmektedir. Bu maddeler arasında fenolikler, glukosinolatlar, syanogenik glukosidler, saponinler, alkaloidler ve antimetabolitler bulunmaktadır (MANSFIELD, 1983; BENNETT ve WALLSGROVE, 1994; OSBOURN, 1996).

Bitkilerde bulunan aktif dayanıklılık şekillerinin harekete geçebilmesi için konukçu ve patojen arasında bir sinyal alışverişi olması gerekmektedir. Konukçuda bulunan ve dayanıklılığı yöneten genlerin aktif hale geçebilmesi için bu genlerin uyarılması gerekmektedir. Konukçu bitkilerde bulunan dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçiren elisitörler, konukçuya özelleşmelerine göre spesifik ve spesifik

olmayan elisitörler olarak iki gruba ayrılırlar (DIXON ve LAMB, 1990). Spesifik olmayan elisitörler, birçok bitkide hastalık oluşturan potansiyel patojenlere karşı dayanıklılık mekanizmasının teşvik edilmesini sağlamaktadır. Bu uyarıcılar konukçu veya patojen orijinli olabilirler. Kimyasal özellikleri araştırılmış bu tip uyarıcıların genellikle proteinler, glikoproteinler, oligosakkaritler, lipid ve türevleri olduğu tespit edilmiştir (EBEL ve COSIO, 1994). Bu şekildeki dayanıklılıkta patojene karşı tam bir korunma sağlanmamaktadır.

Spesifik elisitörler ise spesifik olmayan elisitörlerden farklı olarak belirli fungal ve bakteriyel patojenlerde mevcut olup (ırka özel) bitkilerde bulunan ve yalnızca bu elisitörleri tanıyan karşılıklı etkileşim genlerini (R geni) harekete geçirerek dayanıklılığın ortaya çıkmasına neden olurlar (KEEN ve LITTLEFIELD, 1979). Bu tip elisitörler aynı zamanda hastalık oluşturmaması nedeniyle bunları kodlayan genler avirülens (*avr*) genler olarak adlandırılmıştır (KEEN,1992; DE WIT, 1995; ALFANO ve COLLMER, 1996). Bugüne kadar *Xanthomonas* ve *Pseudomonas* cinsine dahil bakteri türlerinden 30'dan fazla avr geni izole edilmiştir (LEACH ve WHITE, 1996). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*-fasulye interaksiyonlarında 5 avr-R gen interaksiyonu tespit edilmiştir (JENNER ve ark., 1991).

İnfeksiyonun teşvik ettiği dayanıklılıkta pasif dayanıklılıktan farklı olarak bir enerji gerekmektedir. Patojenden gelen elisitör ile konukçu bitkideki reseptör arasındaki spesifik etkileşim sonucu infeksiyon noktasında birçok savunma mekanizması harekete geçirilir (ATKINSON, 1993). Bitkilerde bu şekilde ortaya çıkan savunma mekanizmalarına örnek olarak aşırı duyarlılık tepkimesi (HR, Hypersensitive Reaction), bitki hücre duvarında oluşan yapısal değişiklikler (lignin, kalloz, HRGP, fenolikler vb.), patojenisite ile ilgili proteinlerin (PR proteinleri) uyarılması ve antimikrobiyal fitoaleksinlerin sentezlenmesi gösterilebilir (VANCE ve ark. 1980; HAHLBROCK ve SCHEEL, 1989; DIXON ve HARRISON, 1990; MANSFIELD, 1990).

Aşırı duyarlılık tepkimesi

İlk olarak STAKMAN tarafından 1915 yılında buğday pasına karşı dayanıklı buğday çeşitlerinde gözlenen HR, fungus penetrasyonuna tepki olarak enfekteli hücrelerin hızlı bir şekilde ölmeleri ile karakterize edilmiştir. Uyumsuz bitki patojen

interaksiyonlarının en çok rastlanan özelliği olan HR, gerek irka spesifik gerekse genel dayanıklılığın gözlemlendiği durumlarda karşılaşılan bir dayanıklılık tepkimesidir (KLEMENT, 1982; CRUTE ve ark. 1985).

MANSFIELD (1990), HR'ın konukçu hücrelerinin patojeni tanımasını takiben hücre membranlarının geri dönüşümsüz zararlanmaları sonucu oluştuğunu bildirmiştir. Hücre membranının zararlanması sonucu tonoplast'ın (vakual membran) fonksiyonunu kaybetmesi, stoplazma düzeninin ve organellerin yapısal olarak bozulmaları, bu tip hücrelerin ölümleriyle sonuçlanır (BROWN ve MANSFIELD, 1991). DANGL ve ark. (1996), uyumsuz ilişki esnasında ortaya çıkan HR'ın, bitki hücresi tarafından genetik olarak programlanan bir çeşit programlanmış hücre ölümleri olduğunu bildirmiştir. HR'ın genetik olarak bitki tarafından programlanmış olduğu son yıllarda elde edilen mutant bitkilerle gösterilmiştir (DIETRICH ve ark. 1994). Bu mutantlar üzerinde herhangi bir avirulent patojen olmadan sadece çevresel uyarıcılar ile teşvik edilen ve HR'a benzeyen nekrotik hücre ölümleri oluşmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda elisitör ile muamele edile ve HR'ın ortaya çıktığı bitki hücrelerinde H^+ , K^+ , Cl^- , ve Ca^{+2} iyonlarında bir hareketlilik ortaya çıktığı belirlenmiştir (ATKINSON, 1993; BAKER ve ark. 1993). Özellikle Ca^{+2} iyonu normal koşullarda hücre stoplazmasında oldukça düşük konsantrasyonda bulunurken, hücrelerin biyotik veya abiyotik faktörler tarafından uyarılması sonucu Ca^{+2} konsantrasyonunda artışın hücre membranında lokalize olmuş olan kalloz synthasa enzimin harekete geçirerek kalloz oluşumunun teşvik edilmesinde, savunma ile ilişkili genlerin aktivasyonunda ve fitoaleksinin sentezlenmesi gibi birçok hücreysel olaylarda rol aldığı bildirilmiştir (STAB ve EBEL, 1987; SOMSSICH ve ark. 1989; DIETRICH ve ark. 1994).

Aktif oksijen türleri (AOS)

Bitki patojen interaksiyonlarının başlangıç aşamasında aktif oksijen türlerinin (AOS, active oxygen species) ortaya çıkması HR oluşumunun en belirgin özelliklerindedir (SUTHERLAND, 1991; MEHDY, 1994; MEHDY ve ark. 1996). Hücreler genelde AOS seviyesini en düşük düzeyde tutabilmek için bazı koruyucu mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bazı koşullarda ise bu koruyucu mekanizmalar aşılarak

virüs ve elisitörlerin kullanıldığı birçok konukçu-patojen sisteminde yaygın olarak görülmüştür (DOKE, 1983; DOKE ve OHASHI, 1988; APOSTOL ve ark. 1989).

AOS türlerinden özellikle H_2O_2 'nin, patojenlere karşı dayanıklılıkta birçok rolü olduğu belirtilmektedir. AOS, sitotoksik etkilerinden dolayı patojenleri öldürerek savunmada ilk hattı oluşturduğu düşünülmektedir. WU ve ark. (1995) H_2O_2 'in hastalıklara karşı dayanıklılıktaki önemini apoplasta H_2O_2 eksprese eden transgenik patates bitkilerini yetiştirerek araştırmışlardır. H_2O_2 ayrıca dayanıklılık mekanizmalarını yönlendiren bazı genlerin teşviklenmesinde rol oynadığı belirlenmiştir. LEVINE ve ark.(1996) 2 mM. gibi çok düşük konsantrasyonsaki H_2O_2 'nin soya fasulyesi hücre süspansiyonunda glutathion S transferaz ve glutathione peroksidaz enzimlerinin transkripsiyonu teşvik ettiğini belirlemiştir. TENHAKEN ve ark. (1995) H_2O_2 'nin bitki hücrelerini direkt olarak öldürdüğünü yapmış oldukları hücre kültürü çalışmaları ile tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda H_2O_2 oldukça yoğun hücre ölümlerine sebep olmuştur.

Bitki dokularında enfeksiyona tepki olarak patojenin uyarısı sonucu oluşan fiziksel bariyerlerin hücre duvarlarını kuvvetlendirip penetrasyonu engellediği kanısına aktif lignin birikimlerinin meydana geldiği yerlerde H_2O_2 'nin lokalize olması ile varılmıştır (OLSON ve VARNER, 1993). BRUCE ve WEST (1989) elisitör kullanarak teşvik ettikleri oksidatif açılımın fasulye bitkisinin hücre duvarında lignin oluşumuna neden olduğunu belirlemişlerdir. BRADLEY ve ark. (1992) fasulye ve soya fasulyesinde yapmış oldukları çalışmada H_2O_2 'nin peroxidase enziminin varlığında hücre duvarının yapısını değiştirerek hidroksi prolince zengin glikoproteinlerin oluşmasına neden olduğunu belirlemişlerdir.

AOS'nin ayrıca bir sinyal vazifesi görerek komşu hücrelerde sistemik kazandırılmış dayanıklılığı (SAR, systemic acquired resistance) teşvik ettiği bildirilmektedir. Salisilik asit genelde SAR'ın oluşumuna neden olan anahtar bileşiktir. Salisilik asit hücrede catalase enzimini durdurarak, ortamda H_2O_2 oluşumunu arttırdığı, sonuçta bitkide PR-1 proteinlerinin sentezlenmesine neden olduğu tespit edilmiştir (CHEN ve ark. 1993). Bu araştırmacılar ayrıca farklı konsantrasyonlardaki H_2O_2 'nin bitkide salisilik asit oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir.

Hücre Duvarında Yapısal Değişimler

Bitki hücre duvarları hücrenin şeklini koruyarak patojen saldırılarına karşı mekanik bir engel olarak görev yaparlar. Buna rağmen bazı patojenler hücre duvarlarını saldırmış oldukları bazı enzimler ile yıkarak hücrenin ölümüne neden olurlar (MANSFIELD ve RICHARDSON, 1981).

Birçok bitki patojen interaksiyonunda enfeksiyona tepki olarak hücre duvarı yapısında bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Bitki hücre duvarlarının iç yüzeyinde bakteri, fungus ve virüslere karşı duvar benzeri materyallerin birikmesi son derece yaygın bir tepkidir. Papilla olarak isimlendirilen bu oluşumlar birçok bitki patojen ilişkisinde oluşmaktadır. Papillalar görünüm olarak çeşitli olup, genelde bakteriyel enfeksiyonlarda yarım ay şeklinde iken, funguslarda penetrasyon hifinin etrafında yuvarlak oval şeklinde ortaya çıkmaktadır (BROWN ve ark. 1995; SKALAMERA ve ark. 1997).

Papillanın kimyasal yapısına dair yapılan çalışmalarda bu birikimler içerisinde en fazla kalloz olduğu tespit edilmiştir (SMART ve ark. 1986). Bitki içerisinde oluşan kalloz, patojenin yayılışını geciktirip bitki hücresinin kendini toparlamasına ve diğer etkili dayanıklılık mekanizmalarının harekete geçmesini sağlar (BENHAMOU, 1992).

Bitkilerin avirülebent bakteriyel ve fungal patojenler veya elisitörler ile muamele edilmeleri sonucu reaksiyon noktalarında fenolik ve lignin benzeri materyallerin biriktiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (VANCE ve ark. 1980; NICHOLSON ve HAMMERSCHMIDT, 1992).

Lignifikasyonun ve fenoliklerin bitki hücre duvarlarını kuvvetlendirerek özellikle bakteriyel patojenler tarafından üretilen hücre duvarını eriten enzim ve hormonlara karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır. Lignifikasyon hücre duvarının geçirgenliğini etkileyerek bitki hücresinden patojene besin aktarılmasını, patojenden konukçu hücreye gönderilen toksin ve enzimlerin geçişini engeller. Ligninin polimerizasyonu sırasında üretilen fenolikler ve serbest radikaller patojene karşı direkt toksik olabilmektedir (VANCE ve ark. 1980).

Bitki hücre duvarlarının kuvvetlendirilmesinde katkıda bulunduğu düşünülen diğer bir grupta hidroxyproline ile zengin glikoproteinler (HRGP) dir. Gerek bakteriyel gerekse fungal patojenlere karşı dayanıklılıkta, hücre duvarlarında oldukça yoğun bir

şekilde HRGP biriktiği bildirilmektedir (BENHAMOU ve ark. 1991; BESTWICK ve ark. 1995).

PR Proteinleri

Bitki hücrelerinde savunma mekanizmaları ile ilişkili olarak çeşitli proteinler biriktirmektedir. Patogenesis ile ilişkili proteinler olarak isimlendirilen ve hidrolitik enzimlerden olan kitinaz ve β -1,3 glukanaaz'lar dayanıklılıkta farklı roller oynamaktadır. Bu enzimlerin birikimlerinin uyumsuz interaksiyonlarda daha hızlı gerçekleşmesi dayanıklılıkta rol oynadığını göstermektedir (JOOSTEN ve DE WITT, 1989).

Fitoaleksinler

Fitoaleksinler, patojen saldırılarına, biyotik ve abiyotik elisitörlere tepki olarak bitki dokusunda hızla oluşturulan farklı kimyasal sınıflardan oluşmuş düşük molekül ağırlıklı sekonder metabolitlerdir (MANSFIELD, 1983). KEEN (1992) hastalıklara karşı dayanıklılıkta fitoaleksinlerin bir rolü olduğunu şu şekilde açıklamaktadır;

- infekteli dokulardaki fitoaleksinin birikiminin yeri ve zamanı ile patojen gelişimi arasında bir ilişki bulunması
- gen-için-gen bitki patojen sisteminde uyumsuz interaksiyonlar ile hızlı fitoaleksinin birikimi arasında pozitif bir korelasyon bulunması
- patojen gelişiminin hızlı bir şekilde engellendiği durumlarda dayanıklılık genleri ile fitoaleksinin birikimi arasında bir ilişki bulunmasına
- metabolik inhibitörlerin kullanılması sonucu duyarlılığın artması ve fitoaleksinin üretiminin bloke edilmesi
- patojenin virülensliği ile fitoaleksinlerin toleranslığı arasında pozitif bir ilişki bulunması
- inokulasyondan önce fitoaleksinin üretiminin teşvik edilmesiyle bitki dokusunda dayanıklılığın artması.

MANSFIELD (1982) birçok bitkide ve özellikle Leguminacea ve Solanacea familyalarında yer alan bitkilerde bazı patojenlere karşı dayanıklılık için fitoaleksinin üretiminin yeterli olabileceğini bildirmiştir.

GNANAMANICKAM ve PATIL (1977a) *P. s. pv phaseolicola*'nın bazı ırklarının fitoaleksineri deoksitive ettiğini bildirmiştir. Patojenin virülensliğinin şiddeti fitoaleksinerin deoksitive edilebilme yeteneğine bağlıdır. Yine benzer şekilde dayanıklı bitkilerde biriken fitoaleksiner patojenin konukçu dokuda çoğalmasını ve toksin üretimini engellemektedir. MANSFIELD (1982) *P. vulgaris* tarafından üretilen fitoaleksinerin *P. s. pv phaseolicola*'ya karşı toksik olduğunu bildirmiştir.

Baklagiller familyası yaygın olarak isoflavonoid üretebilmektedir. İsaflavonoid bileşikler molekül ağırlıklarına göre isoflavone, isaflavanone, pterocarpan ve isoflavan olarak gruplara ayrılmaktadır. Fasulye bitkisinde, kievitone (isoflavone), phaseollin (pterocarpan), phaseollidin (pterocarpan), ve phaseollinisoflavane (isoflavane) olarak 4 tane fitoaleksin üretilmektedir. Fasulye bitkisinde patojen saldırısı dışında $CuSO_4$ solüsyonu ile muamele, UV ışık uygulaması veya soğuk uygulaması gibi abiyotik etmenler de fitoaleksin üretimini teşvik etmektedir.

Yapılan bu çalışmada fasulye hale yanıklığı etmeni *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*'nın çeşitli ırklarının, farklı fasulye çeşitleri üzerindeki reaksiyonları tespit edilerek, hastalığa karşı dayanıklılık gösteren fasulye çeşitlerindeki dayanıklılık mekanizmaları gerek yapraklarda gerekse fasulye meyvelerinde (kapsül) yapılacak olan biyokimyasal ve çeşitli histokimyasal boyamaların kullanılacağı mikroskopik yöntemler ile belirlenmeye çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

BAILEY ve BURDEN (1973), Tütün mozaik virüsü (TMV) ile inokule edilen fasulye yapraklarında hücrel kahverengileşmeler ve bu alanlarda birçok fenolik maddenin üretildiğini ve bu fenolik maddelerden bazılarının TLC plakaları üzerinde fungus gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu bileşiklerden 4 tanesini phaseollin, phaseollidin, phaseollinisoflavan ve kieviton olarak izole etmişlerdir.

SIGEE ve EPTON (1975), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Race1) ile inokule edilen Red Mexican (dayanıklı) ve Prince (duyarlı) fasulye çeşitlerinde inokulasyondan 2 saat sonra hem uyumlu hem de uyumsuz reaksiyonlarda inokule edilen alanlarda ıslaklık oluştuğunu tespit etmişlerdir. Uyumlu reaksiyonlarda 24 saat sonra tekrar ıslaklık belirtilerinin görüldüğünü, 96 saat sonra ise bu alanların bronzlaşmaya başladığını, uyumsuz reaksiyonlarda ise inokulasyondan 24 saat sonra inokule edilen alanlarda camlaşma olarak adlandırılan kurumaların ve daha ileri dönemlerde nekrotik lekelerin oluştuğunu bildirmişlerdir.

SIGEE, ve EPTON (1976) *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın farklı ırklarını French bean fasulyesinin kotiledon yapraklarına inokule etmiş ve bitkide oluşan reaksiyonları ışık ve elektron mikroskopunda incelemişlerdir.

LONG ve ark. (1985), farklı soya fasulyesi çeşitlerinin *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*'nın farklı ırkları ile inokulasyonu sonucu dayanıklılık gösteren konukçu hücrelerdeki reaksiyonları ve hücrelerde bir fitoaleksinin olan glyceolin birikimini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada fitoaleksinin birikimiyle bakteriyel populasyon arasında ters bir orantı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca dayanıklılığa ve duyarlılığa neden olan ırklar birlikte inokule edildiğinde hücrelerde yine dayanıklılık reaksiyonlarının meydana geldiğini ve dayanıklılığa neden olan ırkın duyarlılığa neden olan ırka karşı fizyolojik olarak dominant olduğunu saptamışlardır.

HARTMAN ve ark. (1986), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 'nın toksik filtratlarına karşı farklı fasulye çeşitlerinin kallus kültürlerinin nekroz oluşumu, nekroz oluşmadan gelişmenin azalması ve normal gelişme şeklinde reaksiyon verdiğini ve

filtrat içeren ortamda geliştirilen dayanıklı çeşitlerin kalluslarında nekroz oluşmadığını belirlemişlerdir.

SOUTHERTON ve DEVERALL (1990), pas fungusu (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) ile inokule edilen dayanıklı buğday çeşitlerinin yapraklarında inokulasyonda 48 saat sonra yüksek konsantrasyonda lignin biriktiğini tespit etmişler ve aşırı duyarlılık gösteren bitkilerde meydana gelen lignifikasyonun yüksek derecede spesifik dayanıklılıkta bir rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

BENHAMOU ve ark. (1991), *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* ile inokule edilen duyarlı ve dayanıklı domateslerde hydroxiplolince zengin glikoproteinlerin (HRGP) birikimini incelemişlerdir. Yaptıkları zaman kursu denemelerinde dayanıklı çeşitlerde duyarlı çeşitlerden daha erken ve yüksek oranda HRGP biriktiğini, uyumsuz reaksiyonlarda patojen tarafından istila edilmemiş hücrelerde de HRGP birikmesinin bu maddelerin fungal penetrasyona karşı koruyucu bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

BENLİOĞLU ve ark. (1994), Fasulye üretimi yapılan 24 farklı bölgeden topladıkları 293 fasulye tohumunu bakteriyel patojenler açısından testlemişler ve 16 bölgeden toplam 62 örneğin bakteriyel yanıklık patojenleri ile bulaşık olduğunu bulmuşlardır.

BENNET ve ark. (1994), *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ile inokule edilen marullarda biriken en önemli fitoaleksinin Lettucenin A olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada *Bremia lactucae*'nin dayanıklılığa neden olan ırkı ile inokule edilen marul yapraklarında HR görülen hücre sayısı ile Lettucenin A birikimi arasında doru orantı olduğunu, *Bremia lactucae*'nin virüent ırkıyla yapılan inokulasyonlarda çok düşük miktarda lettucenin A biriktiğini belirlemişlerdir.

DAI ve ark. (1996), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* ile inokule edilen pamuk kotiledon yapraklarında inokulasyondan 10 saat sonra flavonid bileşiklerin biriktiğini, konukçu hücre duvarında oluşan kallos ile zenginleştirilmiş

papilla içerisinde ve orta lamelde fenol benzeri maddelerin biriktiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte inokulasyondan 4 saat sonra dayanıklı bitkilerde peroksidase aktivitesinde artış meydana gelirken, dayanıklı ve duyarlı çeşitlerde lignin, suberin ve catechin birikiminde bir değişiklik olmadığını, dayanıklı bitkilerde görülen HR ile flavonoid birikimi arasında bir ilişki olduğunu ve peroxidase aktivitesinin hücre duvarı ve paramural papillada flavanoid oluşumunda bir rolü olduğunu bildirmişlerdir.

MILOSEVIC ve SLUSARENKO (1996), Red mexican fasulye çeşidinin 7-9 günlük kotiledon yapraklarını *Pseudomonas phaseolicola*'nın avirulent ve virülen ırklarıyla inokule ederek HR'ın meydana geldiği uyumsuz reaksiyonlarda görülen aktif oksijen metabolizmasını ve lignifikasyonu incelemişlerdir. Özellikle uyumsuz reaksiyonlarda bitki hücrelerinde asidik peroxidase, xanthine oxidase ve glutathione reductase aktivitesinin arttığını, katalaz aktivitesinin ise azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca *In situ* koşullarda peroksidaz aktivitesinin inokule edilen dokularda lignin birikimi ile doğru orantılı olduğunu ve HR oluşumunda aktif oksijen türlerinin önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

BESTWICK ve ark. (1997), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ile inokule edilen marullarda bakterinin istila ettiği hücrelere komşu olan hücrelerde yüksek oranda hidrojen peroksit (H_2O_2) biriktiğini, inokule edilmemiş bitkilerde ise H_2O_2 'nin yalnız ksilem damarlarında bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak lokalize bir şekilde biriken H_2O_2 'nin antimikrobiyal bir etmen gibi rol oynadığını bildirmişlerdir.

THORDAL-CHRISTENSEN ve ark. (1997), arpa-külleme patojeni interaksiyonunda 3,3-diaminobenzidine (DAB) ile boyama tekniğiyle dayanıklı reaksiyonlarda oluşan papilladaki H_2O_2 birikimini tespit etmişler ve arpa yapraklarının inokulasyonundan 6 saat sonra primer çim tüplerinin, inokulasyondan 15 saat sonra ise apresorium'un altındaki bitki hücrelerinde H_2O_2 biriktiğini bildirmişlerdir.

FOURIE, D. (1998), Güney Afrika'da fasulye üretimi yapılan alanlardan izole ettikleri 1138 izolattan 967 tanesinin *P. s. pv. syringae* olduğunu tespit etmişlerdir. Bu izolatlardan 255'ini fasulye çeşitlerinin göstermiş olduğu reaksiyonlara göre ırklara

ayırmışlar ve bakterinin 7 farklı ırkını tanımlamışlardır. Bu ırklardan 1, 2, 6 ve 8. ırkın geniş bir alana yayıldığını, 9. ve 2. ırkın ise bir veya iki bölgede lokal olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

SORIANO-RICHARDS ve ark. (1998), *Colletotrichum lindemuthianum* ile inokule edilen dayanıklı Flor de Mayo fasulye çeşidinde inokulasyondan sonra hipokotillerde phaseollin ve phaseolilidinin bir savunma mekanizması sonucu konukçu hücrelerinde biriktiğini, bununla beraber phaseollidinin, phasollinden daha erken ve daha yüksek konsantrasyonda biriktiğini bildirmişlerdir.

LATUNDE-DADA ve ark. (1999), hemibiotrophic bir fungus olan *Colletotrichum destructivum* ile inokule edilen iki börülce (*Vigna unguiculata*) çeşidinde görülen farklı reaksiyon tiplerini ışık mikroskopu ile incelemişlerdir. Duyarlı çeşit olan cv. IT82E-60'ın dokularında inokulasyondan sonra necrotrofik sekonder hifleri takiben interselüler infeksiyon keselerinin oluştuğunu, dayanıklı çeşit olan cv. TWX3236' da ise apposerium oluşumunda azalmaların meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca dayanıklı çeşitlerde HR sonucu hastalık gelişiminin yıkıcı nekrotrophic fazı bloke edilmiştir. Dayanıklı çeşitlerin gövde dokularında kievitone ve phaseollin'nin infeksiyonun erken döneminde ve çok hızlı bir şekilde biriktiğini, buna karşın duyarlı çeşitlerde ise fitoaleksinlerin çok yavaş biriktiğini ve bu dokularda ıslaklık ve tipik antraknoz lezyonlarının meydana gelmesiyle hastalığın geliştiğini bildirmişlerdir.

SOYLU (1999), *Arabidopsis thaliana* üzerinde mildiyö hastalık etmeni *Peronospora parasitica*'nın gelişimi konusunda yaptığı çalışmada, uyumlu ilişkinin gözleendiği duyarlı ekotipler üzerinde yoğun bir sporulasyon ve hif gelişimi, uyumsuz ilişkinin meydana geldiği dayanıklı ekotiplerde HR sonucu fungal gelişimin etkili bir şekilde sınırlandırıldığını, inokulasyon noktalarında görülen HR ile hücre duvarlarında oluşturulan kalloz, lignin ve H₂O₂ birikimleri arasında yakın bir ilişki olduğunu bildirmiştir.

VEINGART ve ark. (2001), *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ve pv. *phaseolicola*'nın virülensliğine etilen üretiminin etkisiniN araştırıldığı çalışmada, etilen negatif (efe) mutant ırklarla normal ırkların inokulasyonundan sonra populasyon yoğunluğu ve bakteriyel gelişmeyi karşılaştırmış ve etilen efe mutant ırklarda populasyon yoğunluğunun daha düşük olduğunu ve bitkide çok zayıf belirtiler oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bitkiler tarafından üretilen etilenin bitkide belirli patojenlere karşı dayanıklılığı teşvik ettiğini saptamışlardır.

KARAKAYA ve ÖZCAN (2001) *Agrobacterium tumefaciens* streyn A281'in farklı fasulye çeşitlerine karşı göstermiş olduğu reaksiyonları tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 4F-2409, Karacaşehir-90, Akman-98 ve Eskişehir 855 fasulye çeşitlerinde inokulasyonu takiben hem epikotil hem de hipokotilde ur oluşurken Afyon-3, IVD-10, Göynük-98, Yunus-90 ve Şehirali-90 çeşitlerinde inokulasyondan sonra ur oluşmadığını bildirmişlerdir.

ABE ve ark. (2002), *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (Psg) ile inokule edilen soya fasulyelerinde uyumsuz reaksiyonlarda fungal gelişimin engellenmesinde fitoaleksinin birikimi dışındaki faktörlerin de etkili olduğunu bildirmişlerdir. Fungusun zoosporları ile inokule edilen kotileden yapraklarda inokulasyondan 16 saat sonra Psg ırk 1'in gelişiminin tamamen engellenirken ırk 9'un gelişmesinin engellenmediğini tespit etmişlerdir. Bununla beraber inokulasyondan 16 saat sonra uyumlu ve uyumsuz reaksiyonlarda bir fitoaleksinin olan glyceollin birikimi açısından önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir. İnokulasyondan 20 saat sonra ve daha sonraki zamanlarda ise yalnızca uyumsuz reaksiyonlarda inokulasyon noktasının etrafındaki hücrelerde çok düşük oranda fitoaleksinin birikimi olduğunu tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kültür Koşulları ve Stok Kültürlerin Saklanması

Çalışmalarda kullanılan *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ırkları John Mansfield (Londra Üniversitesi, Imperial Collage)'den temin edilmiştir. Bu ırkların özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bakteriler rutin olarak Luria Bertani (LB) agar, LB broth veya King's B (KB) agar üzerinde 25-28°C'de kültüre alınmıştır. Sıvı kültürler orbital inkübatörlerde 150-200 rpm'de çalkalanarak geliştirilmiştir. Uzun süreli saklamalar için kültürler gliserol içerisinde -20°C'de saklanmıştır .

Pseudomonas türleri ultraviyole (UV) radyasyonda 366 nm'de kontrol edilmiştir; bu koşullarda bakteri karakteristik olarak sarı-yeşil pigmentler üretmektedir. Kültürler rutin kullanımlar için petri kaplarında 5°C'de saklanmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Çalışmada kullanılan tüm ortamlar 121°C'de 15dk. otoklav edilmiştir.

3.2.1. King's B Ortamı

Protease pepton	20g/l
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	2.5g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	6g/l
Glyserol	30m/ll
Agar	15g/l

3.2.2. Luria Bertani Ortamı

Tryptone	10g/l
Yeast Extract	5g/l
NaCl	5g/l
Glucose	1g/l
Agar	15g/l

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan *P. s. pv. phaseolicola*'ya ait ırklar ve bunların bazı özellikleri

Irklar		Karakteristik özelliği	Referans
1281A	Race1		D. Teverson ^b
882	Race2		D. Teverson
1301A	Race3		Hitchin ve ark. (1989)
1302A	Race4		Jenner ve ark. (1991)
1375AR	Race5	1375A'dan üretilmiştir Rif ^R	D. Teverson
1448AR	Race6	1448A'dan üretilmiştir Rif ^R	Fillingham ve ark. (1992)
1449AR	Race7	1449A'dan üretilmiştir Rif ^R	D. Teverson
2656A	Race8		D. Teverson
2709A	Race9		D. Teverson
1448:143	hrpL	Race 6'nın hrpL mutanı Kan ^R	Mansfield ve ark. (1994)

Rif^R: Rifampicine dayanıklı, Kan^R:Kanamycine dayanıklı

b Bahçe Bitkileri Araştırma Enstitüsü

3.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Patojenisite Testleri

3.3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Denemelerde kullanılan fasulye çeşitleri ve özellikleri çizelge 3.2'de verilmiştir. Kapsüller cam seralarda 18-24°C'de yetiştirilen bitkilerden elde edilmiştir. İnokulasyonlarda henüz tohum bağlamamış genç kapsüller kullanılmıştır. Yaprak inokulasyonları için kullanılacak bitkiler, 22°C sıcaklık, 16saat/günlük bir fotoperyot ve toprak seviyesinde en az 40W/m² ışık yoğunluğuna sahip olan iklim odalarında yetiştirilmiştir.

Çizelge3.2. Denemede kullanılan fasulye çeşitleri ve kullanım amaçları.

Roma-II ^a	Kuru (tohumluk)
Yunus-90 ^a	Kuru (tohumluk)
Şehir-90 ^a	Kuru (tohumluk)
Göynük-98 ^a	Kuru (tohumluk)
Karacaşehir-90 ^a	Kuru (tohumluk)
Şekerli ^b	Yeşil (taze tüketim)
Magnum ^b	Yeşil (taze tüketim)
Ayşekadın ^b	Yeşil (taze tüketim)
Gina ^c	Yeşil (taze tüketim)
Efequen ^c	Yeşil (taze tüketim)
Cilena ^c	Yeşil (taze tüketim)

a. Ege Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü

b. Üreticiden

c. Semito Tohumculuk

3.3.2.Fasulye Kapsüllerinin İnokulasyonu

Kapsüller steril kürdanlarla yaralama yöntemi ile inokule edilmişlerdir. Steril petripler içerisindeki KB besi yerlerinde geliştirilen iki günlük bakteri kültürlerinden kürdan ile alınan bakteri kolonileri kapsüller üzerine aktarılmıştır. İnokulasyon noktaları arasında 0.5cm boşluk bırakılmıştır. Bu kapsüller, tabanında ıslak kurutma kağıtları bulunan şeffaf plastik kaplar içerisinde 22°C sıcaklık ve 12saat/günlük fotoperiyot'a sahip inkübatörlere yerleştirilmiştir. İnokulasyondan sonraki 7 gün boyunca 24 saat arayla simptom gelişimi gözlemlenmiştir

3.3.3. Kotiledon Yaprakların İnokulasyonu

Yaprak inokulasyonlarında, 14-21 günlük bitkilerin kotiledon yaprakları kullanılmıştır. Bakteriler 10ml LB agar ortamı içerisinde gece boyu geliştirilmiştir. Gelişen bakteriler 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Üst taraftaki süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet kısmı toplanarak 10 mM steril MgCl₂ içerisinde tekrar süspansiyon edilip santrifüj işleminden geçirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet 10mM MgCl₂ içerisinde tekrar süspansiyon edilmiştir. Oluşan süspansiyonun konsantrasyonu 620nm'de 0,26 veya 0,13 OD (Optik Densite)'de spektrofotometre ile belirlenmiştir.

OD 0.26= 2×10^8 hücre/ml ve OD.0.13= 10^8 hücre/ml'ye denk gelmektedir. İnokulasyon şırınga ile yaprakların alt yüzeylerine damar aralarına yapılmıştır. İnfiltrasyon bölgelerinde karışmayı önlemek için her yaprağa en fazla 6 inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyon yapılan bölgenin etrafı kalem ile işaretlenmiştir. İlk belirtiler inokulasyondan 10-15 saat sonra görülmüştür.

3.4.Fitoaleksinin İzolasyonu

3.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnokule edilen kapsüllerin inkübasyondan 24-48-72 ve 96 saat sonra inokulasyon noktalarından steril bir bistiiri ile her ırk için toplam 0,5 mg. ağırlığında dokular alınarak 15 ml.'lik santrifüj tüplerine konmuştur. Bu örneklerin üzerine 5 ml. metil alkol ilave edilmiş ve homogenizator ile parçalanmıştır. Hazırlanan ekstraksiyon daha sonra 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve üstte biriken süpernatant alınarak Rotary Evaporatorda (Buchi) 45°C'de kurutulmuştur. Kalan örnek 500µl etanolde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Bu süspansiyonun 200µl'si ince tabaka kromatografisi (TLC) tabakalarına (Merck Si gel F₂₅₄) yüklenmiştir.

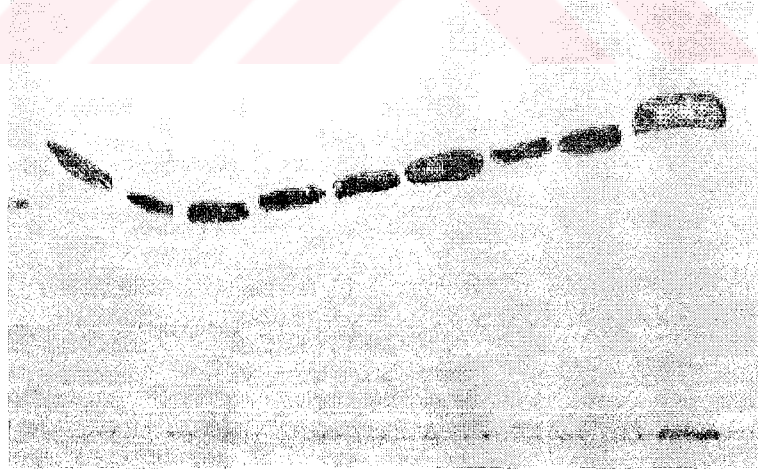
Kromatogramlar ön kalibrasyon tanklarında kloroform:ethanol (100:3 oranında) ile geliştirilmiş ve UV altında 254nm'de bakılmıştır. Oluşan bantlar daha önceden tespit edilmiş değerler ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bantların R_f değerleri ve UV altındaki görünüşleri karakteristik olup fitoaleksinin belirlenmesinde önemlidir (Çizelge 3.3). Fitoaleksinin konsantrasyonunun belirlenmesinde daha önceden belirlenmiş standart değerler ile UV absorpsiyon spektrumu esas alınmıştır.

Çizelge 3.3. Fasulye bitkisinde sentezlenen fitoaleksinin karakteristik özellikleri. R_f değerleri chloroform:ethanol solüsyonunda hazırlanan ekstraksiyonun Merck silica gel 60 F254 tabaka'larına yüklenerek elde edilmiştir (BAILEY ve BURDEN, 1973)

Fitoaleksin	M.W.	λ max	R _f
Kievitone	356	210nm, 294nm, 340nm	0.05
Phaseollin	322	210nm, 230nm, 280nm,286nm,315nm	0.5
Phaseollidin	324	214nm, 230nm, 281nm, 287nm.	0.37
Phaseollinisoflavan	324	210nm, 229nm, 290nm, 310nm.	0.27

3.4.2. İnokule Edilen Dokularda Biriken Fitoaleksin Miktarının Belirlenmesi

P. s. pv. phaseolicola'nın farklı ırkları ile inokule edilen fasulye kapsüllerinden değişik zamanlarda inokulasyon bölgelerinden örnekler alınarak metil alkol (gr/5ml) içerisinde ekstrakte edilmiştir. Hazırlanan solüsyon daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi TLC tabakalarına yüklenerek uygun solvent içeren tanklarda geliştirilmiştir. Tabakalar üzerinde oluşan phaseollin bantları 254 nm. dalga boylu UV ışık altında belirlenerek kurşunkalemle işaretlenmiştir. İşaretlenen bu bantlar steril bistüri ile kazınarak (Şekil 3.1) steril eppendorf tüplere konmuş ve üzerine 1ml metil alkol (%100) ilave edilerek slika çökene kadar mikrosantrifüjde yüksek devirde (16000 rpm) 10 dk. santrifüj edilmiştir. Üst kısımdaki metil alkol+phaseollin solüsyonu alınarak UV spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda OD değerleri belirlenmiştir. Solüsyon içerisindeki phaseollin konsantrasyonu BAILEY ve BURDEN (1973) tarafından bildirildiği gibi extinction coefficient ve moleküler ağırlığına göre $\mu\text{g/gr}$ taze ağırlık olarak hesaplanmıştır ($\log_e:4.04$)



Şekil 3.1. Farklı çeşit-ırk interaksiyonlarında ortaya çıkan ve UV ışık altında işaretlenerek steril bistüri ile kazınan phaseollin bantları

3.4.3. Fitoaleksinlerin Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi (Bioassay)

Fitoaleksinlerin antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesinde PDA (Potato Dextrose Agar) besiyerinde geliştirilmiş *Botrytis cinerae* fungusu kullanılmıştır. Petri kabında gelişen funguslar Potato Dekstrose Nutrient (agarsız) içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir ve filtreden geçirilerek miselyal artıklar uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan bu süspansiyon daha önceden anlatıldığı gibi TLC tabaka'larına yüklenerek chloroform:ethanol (100:3) içerisinde geliştirilen kromotografi üzerine spreyle püskürtülmüştür. Bu tabakalar içerisinde steril saf su ile ıslatılmış steril kurutma kağıtları bulunan plastik kaplar içerisinde +24°C'de inkübasyona bırakılmış ve fitoaleksin bantlarının bulunduğu bölgelerdeki inhibisyon zonları gözlenmiştir.

3.5. *P. s. pv. phaseolicola*'nın Irkları ile İnokule Edilmiş Fasulye Çeşitleri Arasında Oluşan Reaksiyonların Işık Mikroskopu Altında İncelenmesi

Bakteri ile infekteli yaprakların mikroskopik gözlemleri ve fotoğraf çekimleri faz kontrast optiklerle ve Kodak fotoğraf makinesi ile donatılmış Olympus BX50 mikroskop altında yapılmıştır. Bakteri ile inokule edilen fasulye yaprakları inokulasyondan 1, 2, 3 ve 5 gün sonra örneklenmiştir. Her örnekleme zamanında, rastgele seçilen infekteli 3 kotiledon üzerinde en az 10 farklı infekteli alan ve bu alanlardan da en az 20 hücre incelenmiştir.

Mikroskop incelemesi yapılacak yapraklar klorofilleri uzaklaştırmak amacıyla %100'lük metanol içerisinde gece boyunca tutulduktan sonra beyazlaşan dokuyu sabitlemek için chloral hidrat (2.5 g/ml) içerisinde 12-24 saat bekletilmiştir. Bu şekilde fikse edilmiş dokuların %50'lik gliserol ile lam-lamel arasında preparatları hazırlanmıştır.

3.6. Bitki Hücre Duvarlarında Gözlenen Dayanıklılık Mekanizmalarının Histokimyasal Boyamalar İle Belirlenmesi

3.6.1. Lignin İçin Boyama

İnfekteli dokularda oluşan lignin, phloroglucinol/HCL testi uygulanarak saptanmıştır (VALLET ve ark.,1996). Bitki örnekleri oda sıcaklığında %1 phloroglucinol içeren %100'lük metanol içerisinde gece boyunca bekletilmiştir. Temizlenmiş bitki doku örnekleri lam üzerine konup üzerlerine 1-2 damla konsantre HCl damlatıldıktan sonra lamel ile kapatılmıştır. Ortalama 10dk. sonra ligninleşmiş yapılarda oluşan renk değişimleri tespit edilmiştir. Boyanmış dokuların 2-4 saat içerisinde renklerini kaybetmelerini önlemek için örnekler hemen incelenerek değerlendirilerek fotoğrafları çekilmiştir

3.6.2. Kalloz İçin Boyama

İnfeksiyon ve reaksiyon bölgelerinde gözlenen kalloz (1,3-β-glukan) oluşumlarını tespit etmek amacıyla anilin blue ile boyama tekniği kullanılmıştır (O'BRIEN ve MCCULLY, 1981). Daha önce metanolde klorofili uzaklaştırılıp chloral hidrat ile muamele edilmiş kotiledonlar oda sıcaklığında 0.1M sodyum fosfat buffer'da (pH 0.8) hazırlanmış %0.05 (w/v) Anilin blue solüsyonunda gece boyunca bekletilmiştir. Örneklerin yine %50'lik gliserol içerisinde preparatları hazırlanmış ve UV ışıklı mikroskop altında incelenmiştir.

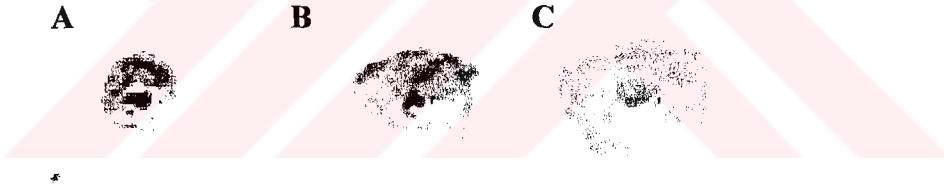
3.6.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) İçin Boyama

İnfekteli dokularda H₂O₂ oluşumunu belirlemek için 3,3'diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solüsyonu kullanılmıştır. Yaprak örnekleri metil alkole konmadan önce 50mM phosphate buffer (pH 6) içerisinde 1mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış DAB solüsyonunda 1 gece bekletildikten sonra metil alkole aktarılmıştır. DAB ışığa duyarlı bir kimyasal olması nedeniyle örnekler karanlıkta bekletilmiştir. Hidrojen peroksidin DAB ile reaksiyona girmesi sonucu reaksiyon noktalarında kahverengileşmeler oluşmuştur(THORDAL-CHRISTENSEN ve ark. 1997).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. *P. s. pv. phaseolicola*'nın Farklı Irklarıyla Farklı Fasulye Çeşitleri Arasında Oluşan İnteraksiyonların Belirlenmesi

İnokulasyonu takiben kapsül ve yapraklarda görülen makroskobik simptomlara göre bitkilerin bakteri ırklarına karşı göstermiş olduğu reaksiyonlar uyumlu ilişki (duyarlılık), uyumsuz ilişki (dayanıklılık) ve kısmi uyumsuz ilişki (orta düzeyde duyarlı) olarak üç kısımda incelenmiştir. Kapsül inokulasyonu sonucunda uyumlu ilişki inokulasyon noktalarında ıslaklık oluşumu, uyumsuz ilişki doku çökmesi ve kahverengileşme (nekroz oluşumu), kısmi uyumsuzluk ise başlangıçta ıslaklık şeklinde görülen belirtilerin etrafında kahverengileşmelerin meydana gelmesi ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.1.) Uyumsuz ilişkinin görüldüğü bazı çeşitlerde infeksiyonun geç dönemlerinde kahverengileşmeler görülmüştür



Şekil 4.1. Kapsül inokulasyonlarının 4. gününde oluşan reaksiyonlar. A. Dayanıklılık; inokulasyon alanında doku çökmeleri ve kahverengileşme B. Kısmi uyumsuzluk, inokulasyon noktasının merkezinde ıslaklık kenarlarında ise kahverengileşme, C. Duyarlılık; inokulasyon noktasında ıslaklık oluşumu

Kapsül inokulasyonunda ilk reaksiyonlar inokulasyondan 1 gün sonra ortaya çıkmış olup inokulasyonun 4. gününde tüm reaksiyonlar birbirinden kesin bir şekilde ayrılmışlardır (Şekil 4.2). Bu sebeple tüm değerlendirmeler infeksiyonun 4. gününde yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Yaprak inokulasyonları sonucunda da zamana ve bitki çeşitleri ile bakteri ırklarına bağlı olarak farklı reaksiyonlar ortaya çıkmıştır. Yaprak inokulasyonlarında hem duyarlı hem de dayanıklılığın görüldüğü reaksiyonlarda meydana gelen nekrotik dokular ilk dönemlerde çok benzer olmasına rağmen duyarlı reaksiyonlarda farklı olarak inokulasyonun ileri döneminde klorotik hale oluşumu meydana gelmektedir.

Çizelge.4.1. Farklı bakteri ırkları ile inokule edilen fasulye çeşitlerine ait podlar üzerinde ortaya çıkan reaksiyonlar

		Irk/avirülens genler (<i>avr</i>) ^a											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
		1	•	•	•	•	•	1	•	1			
		•	2	•	2	2	•	2	•	•			
		•	•	3	3	•	•	•	•	•			
Fasulye çeşitleri	Dayanıklılık ^a genleri (<i>R</i>)	•	•	•	•	4	•	•	•	•			
	1	2	3	4	5	•	•	•	•	5	5		
Canadian Wonder ^a	•	•	•	•	•	S	S	S	S	S	S	S	S
Tendergreen ^a	•	•	3	•	•	S	S	R	R	S	S	S	S
Red Mexican ^a	1	•	•	4	•	R	S	S	S	R	S	R	S
A43 ^a	•	2	3	4	5	S	R	R	R	R	S	R	R
Roma II	?	?	?	?	?	M	S	S	S	S	S	S	S
Yunus 90	?	?	?	?	?	S	S	R	R	M	S	S	S
Sehirci 90	?	?	?	?	?	S	M	R	R	R	S	M	S
Göynük 98	?	?	?	?	?	S	M	R	R	R	S	R	S
Karacaşehir 90	?	?	?	?	?	M	M	R	R	R	S	M	S
Magnum	?	?	?	?	?	S	S	R	R	S	S	S	S
Şekerli	?	?	?	?	?	S	S	R	R	R	S	M	S
Ayşekadın	?	?	?	?	?	R	M	R	R	R	S	M	S
Efequen						R	S	S	S	S	S	S	S
Cilena						R	S	S	S	S	S	S	S
Gina						S	S	R	R	S	S	S	S

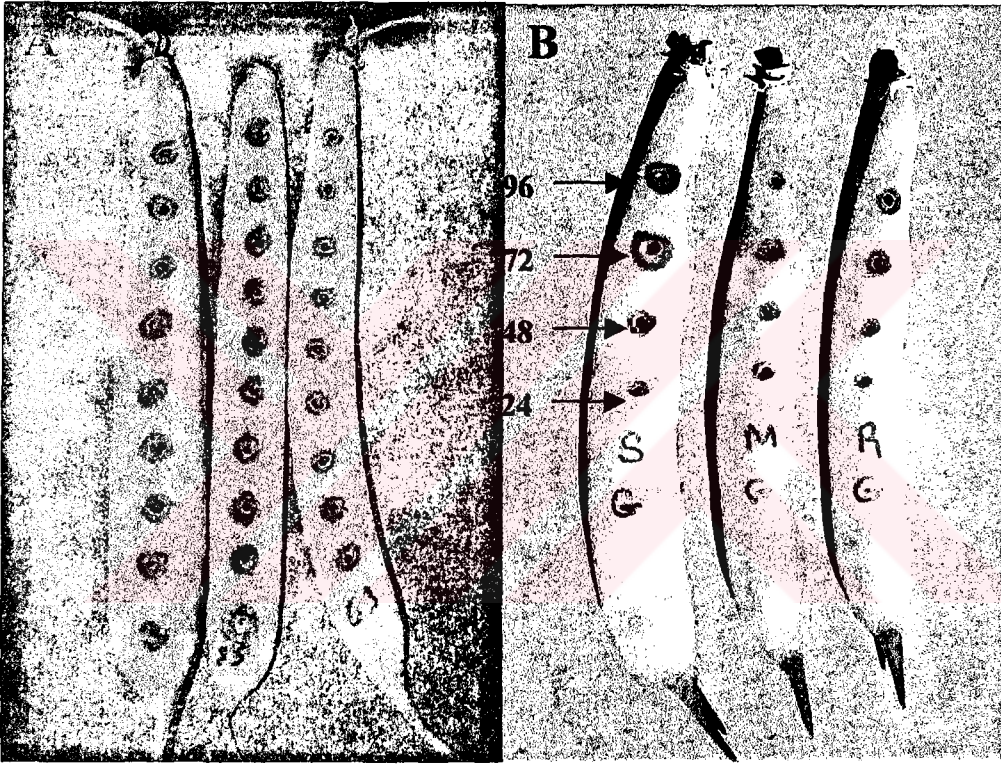
^a Taylor ve ark. (1996) ve Mansfield ve ark. (1994)'e göre

S (duyarlı) = İnokulasyon noktalarında ıslaklık oluşumu

R (dayanıklı) = İnokulasyon noktalarında kahverengileşme ve doku çökmeleri

M (orta düzeyde dayanıklı) = İnokulasyondan sonraki ilk iki günde ıslaklık daha sonra inokulasyon bölgesinin ortasında kahverengileşme ve etrafında ıslaklık oluşumu

İnokulasyonu takiben yapılan gözlemler sonucu uyumlu ilişki inokulasyon alanında infeksiyonun ilk dönemlerde ıslaklık lezyonları, ilerleyen dönemlerde ise bu belirtilerin etrafında sarı bir hale oluşumu ile, uyumsuz ilişki inokule edilen alanlarda camlaşma olarak adlandırılan kurumalar ve doku çökmeleri, yaprak alt yüzeyinde kahverengileşmeler, kısmi uyumsuzluk ise ilk dönemlerde ıslaklık oluşumu sonraları ise bu alanlarda dayanıklılıkta olduğu gibi doku çökmeleri ve yaprak alt yüzeyinde damarlarda görülen kahverengileşmeler ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.4).

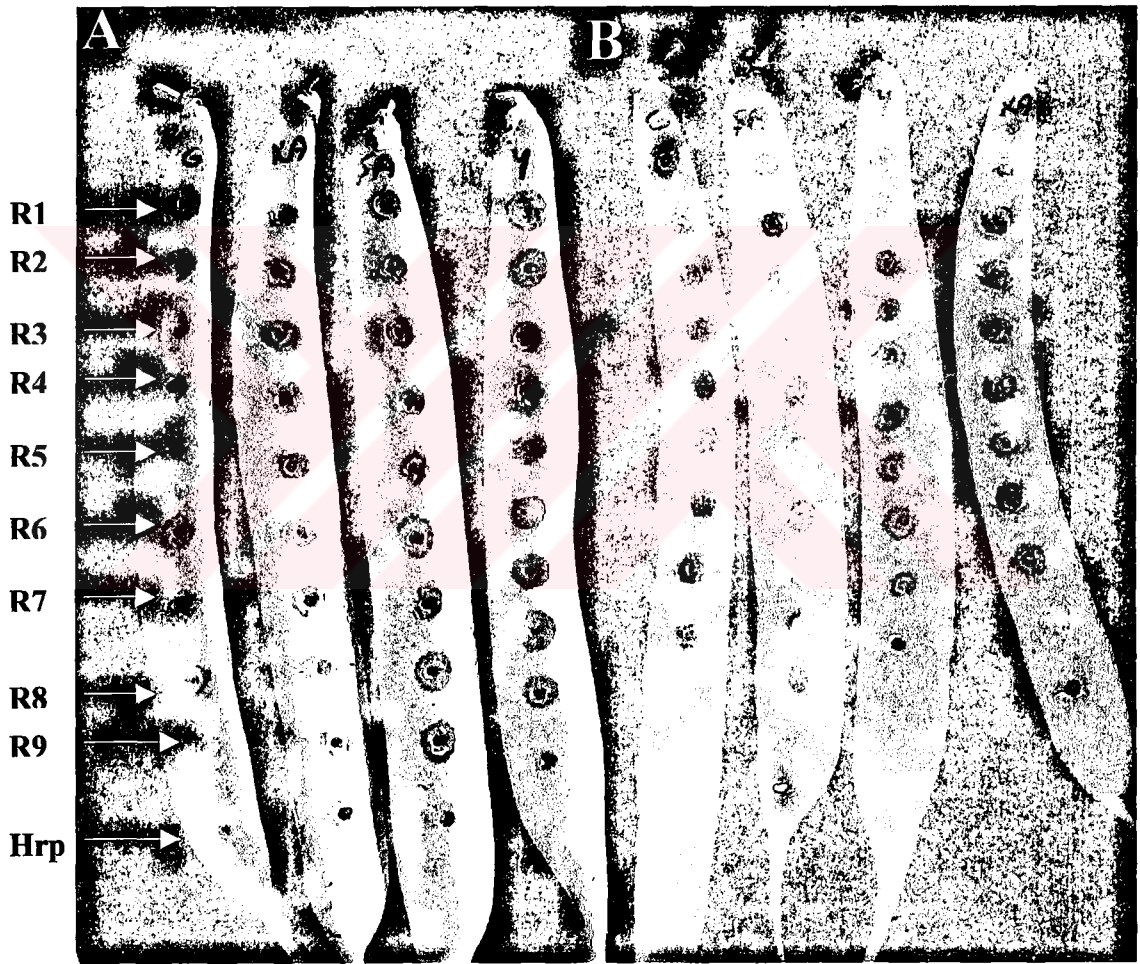


Şekil 4.2. A. İnokulasyonun 4. gününde oluşan duyarlılık, orta düzeyde dayanıklılık ve dayanıklılık reaksiyonları. B. Zamana bağlı olarak semptom gelişimi

4.1.1. Uyumlu İlişki

Kapsül inokulasyonları sonucu fasulye çeşitlerinden Roma-II, Efequen ve Cilena *P. s. pv. phaseolicola*'nın 1. ırkı dışındaki tüm ırlara, Yunus-90 1, 2, 6, 7, 8 ve 9. ırlara, Şehirli-90 ve Göynük-98 1,6,8 ve 9. ırlara, Karacaşehir-90 ise 6, 8 ve 9. ırlara, Magnum ve Gina 1, 2, 5, 6, 7, 8 ve 9. ırlara, Şekerli 1, 6, 8 ve 9. ırlara, Ayşe Kadın çeşidi ise 6, 8 ve 9. ırlara karşı uyumlu reaksiyon göstermiştir. Bu tip

reaksiyonlarda duyarlılığın belirtisi olan ıslaklık oluşumu gözlenmiştir ve infeksiyonun ileri dönemlerinde eksudat oluşumu gözlenirken bazı uyumlu reaksiyonlarda ise infeksiyonun 5. gününden itibaren kahverengileşmeler görülmüştür (Şekil 4.3). Benzer şekilde HARPER ve ark. (1987) yaptıkları çalışmada *P. s. pv. phaseolicola* ırk 1'in Canadian Wonder çeşidinde normalde duyarlı reaksiyona neden olurken inokulasyonun 5. gününden itibaren inokulasyon noktalarında kahverengileşmeler başladığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.3. İnokulasyonun 4. (A) ve 7. (B) günlerinde fasulye çeşitlerinin *P. s. pv. phaseolicola*'nın farklı ırklarına karşı göstermiş olduğu reaksiyonlar

Yaprak inokulasyonlarında ise ilk makroskobik simptomlar inokulasyondan 1 gün sonra gözlenmiştir. İnokulasyonun 3. gününden itibaren inokule edilen alanın etrafında sararmalar gözlenmiştir. İnokulasyondan 96 saat sonra bu klorotik sararmalar artmış ve 7. günden itibaren tüm yapraklar sararak dökülmeye başlamıştır (Şekil 4.4).

Yapraklarda meydana gelen bu hale oluşumu ve kloroza bakteriyel bir toksin olan phaseolitoksinin neden olduğu bildirilmiştir (SIGEE, 1993).

4.1.2. Kısmi Uyumsuz İlişki

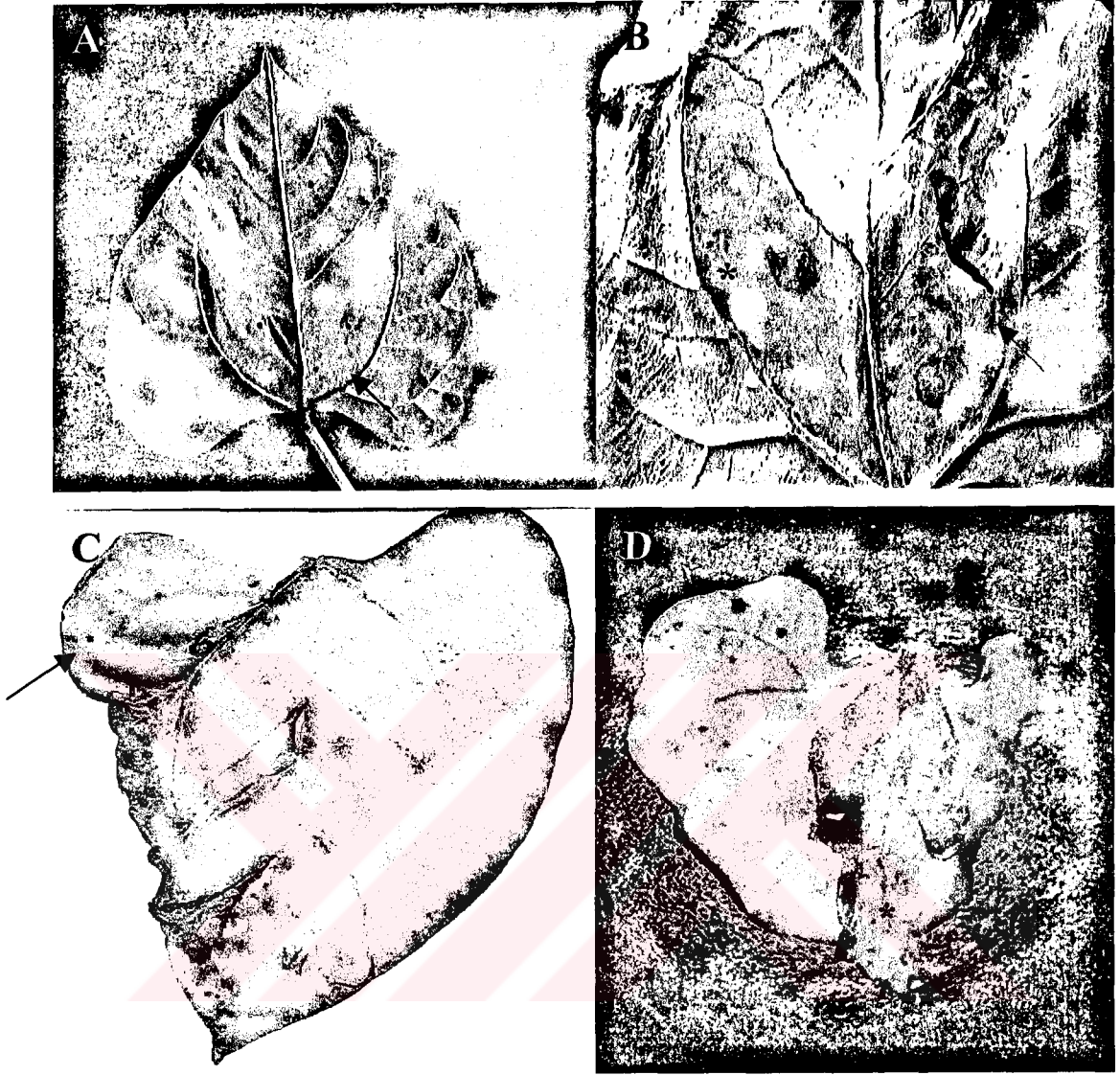
Roma-II 1. ırka, Yunus-90 7. ırka, Şehirali-90 2 ve 7. ırklara, Göynük-98 2. ırka, Karacaşehir-90 1, 2 ve 7. ırka, Şekerli 7. ırka ve Ayşe Kadın çeşidi ise 2 ve 7. ırklara karşı kısmi uyumsuzluk göstermiştir. Bu tip reaksiyonlarda inokulasyondan 1 gün sonra infekteli alanlarda ıslaklık gözlenirken infeksiyonun 2. gününden itibaren inokulasyon noktasının merkezinde ıslaklık bu ıslaklığın etrafında ise kahverengileşmeler gözlenmiştir.

Yaprak inokulasyonlarında kasüllerde olduğu gibi inokulasyondan 1 gün sonra ıslaklık gözlenirken 2. günden itibaren infekteli alandaki yaprak damarlarında hafif kahverengileşmeler gözlenmiştir.

4.1.3. Uyumsuz İlişki

Kapsül inokulasyonları sonucu Efequen ve Cilena 1. ırka, Yunus-90, Magnum ve Gina 3 ve 4. ırklara, Şehirali-90, Karacaşehir-90 ve Şekerli 3, 4 ve 5. ırklara, Göynük-98 3, 4, 5 ve 7. ırklara, Ayşe Kadın ise 1, 3, 4, ve 5. ırklara karşı uyumsuz reaksiyon göstermiştir. Uyumsuz ilişkinin gözlendiği reaksiyonlarda inokulasyonun 1. günü diğer iki reaksiyonda olduğu gibi ıslaklık oluşumu gözlenmiştir. İnokulasyonun 2. gününden itibaren bu alanlarda dayanıklılığın karakteristik belirtisi olan aşırı duyarlılık (HR) sonucu doku çökmeleri ve kahverengileşmeler gözlenmiştir.

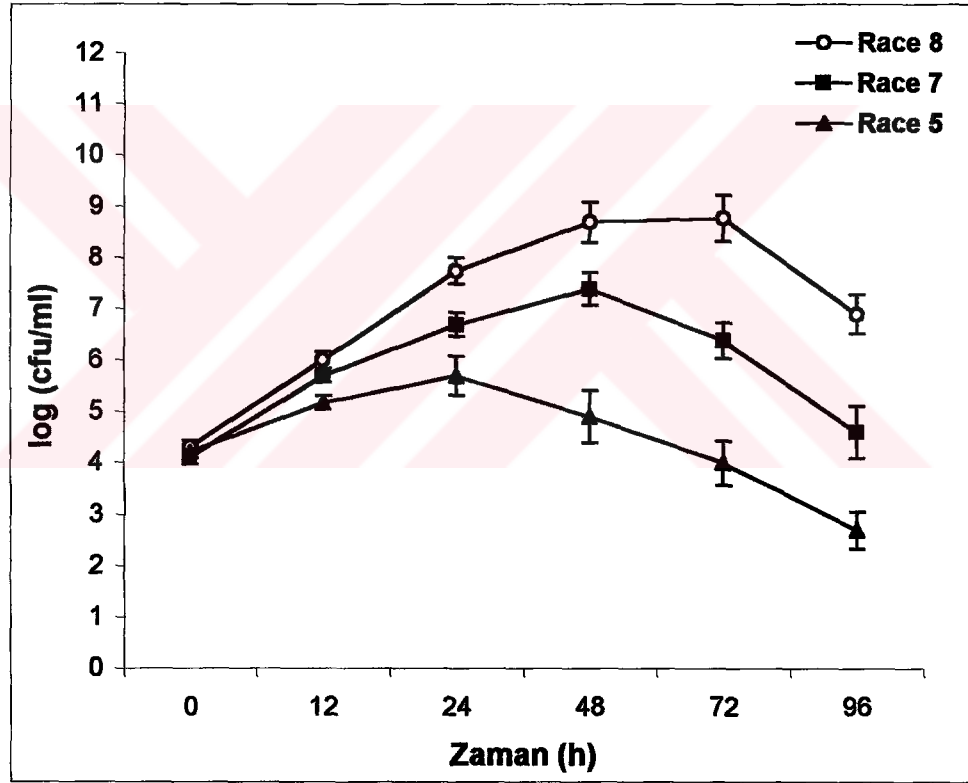
Yaprak inokulasyonlarında ise ilk makroskobik belirtiler inokulasyondan 12 saat sonra inokulasyon yapılan alanda yaprak alt yüzeyinde parlamalar şeklinde ortaya çıkmıştır. İnokulasyondan 24 saat sonra ise bu alanlarda doku çökmeleri ve camlaşma olarak tanımlanan kurumalar gözlenmiştir. Yaprak alt yüzeyinde ise inokule edilen alandaki damarlarda kahverengileşmeler meydana gelmiştir.



Şekil 4.4. Fasulye yaprakları üzerinde ortaya çıkan uyumlu, uyumsuz ve kısmi uyumsuz reaksiyonlar. **A.** İnokulasyonun ilk dönemlerinde dayanıklılığın görüldüğü alanda damarlarda kahverengileşmeler (ok) **B.** İnokulasyonun ileri dönemlerinde kısmi uyumsuz (*) ve uyumsuz ilişki (ok) sonucu oluşan reaksiyonlar. Dayanıklılığın gözlemlendiği alanlarda camlaşma olarak adlandırılan kurumalar ve doku çökmeleri ve damarlarda kahverengileşmeler. **C.** İnokulasyonun 4. gününde uyumlu reaksiyonlarda inokulasyon bölgesinin etrafında toksin üretiminden dolayı sararmalar (ok ile gösterilen). **D.** İnokulasyonun 7. gününde virülene ile inokule edilen alanın etrafında toksin üretiminden dolayı yoğun kloroz oluşumu ve kurumalar (*)

4.2. Bakteriyel oğalma

Steril şınga ile inokule edilen yapraklarda uyumlu ilişkinin gözlendiği reaksiyonlarda virülent ırkın hızla çoğalarak bakteri populusyonunun ilk 48 saat içinde başlangıçtaki sayılarının 500 katına ulaşmış olduğu (5×10^8 hücre/ml) belirlenmiştir. Bu artış infeksiyondan 4 gün sonra yaprakların nekrotik hal almasıyla azalmaya başlamıştır (8×10^6 hücre/ml). Dayanıklılığın gözlendiği yapraklarda avirlent ırkın populusyonu, ilk 24 saat içinde başlangıçtaki sayılarına göre 4 kat (5×10^5 hücre/ml), artmış olup, infeksiyondan 4 gün sonra bakteri sayısı azalarak 5×10^2 hücre/ml'ye düşmüştür (şekil 4.5). HR oluşumuyla bakteriyel çoğalma arasında ters bir orantı olduğu tespit edilmiştir.



şekil 4.5. Farklı *P.s. pv. phaseolicola* ırkları ile inokule edilmiş fasulye kotiledon yapraklarında (cv. şehirali-90) bakteri populusyon gelişimi. Elde edilen değerler 3 farklı yapraktan alınan örneklerin ortalamasını göstermektedir. \pm , standart hata

4.3. Fasulye Bitkisinin Hale Yanıklığı Etmeni (*P. s. pv. phaseolicola*)'ne Karşı Gösterdiği Reaksiyonların Işık Mikroskobu Altında İncelenmesi

Kotiledon yaprakların inokulasyonunu takiben daha önceden bildirildiği şekilde yaprak preparatları hazırlanmış ve örnekler Olympus BX50 marka mikroskop altında incelenmiştir. Yapılan gözlemler, üç farklı reaksiyonun karşılaştırılması ile yapılmış ve inokulasyonu takiben farklı saatlerde hücreler arası boşluklardaki bakteriyel kolonizasyon ve mezofil hücrelerinde görülen farklılaşmalar kayıt edilmiştir.

4.3.1. Uyumlu İlişki

Yaprak inokulasyonundan 24 saat sonra mezofil hücrelerde herhangi bir bozulma gözlenmezken hücreler arası boşluklarda büyük bakteri kolonileri tespit edilmiştir (Şekil 4.6). İnokulasyondan 48 saat sonra bakteriyel kolonilerde artış devam ederken 72. saatten itibaren bu alanlarda phaseolitoksin üretiminden dolayı mezofil hücrelerinde bozulmalar belirlenmiş ve populasyon yoğunluğunda azalmalar tespit edilmiştir. İnokulasyonun 4. gününden itibaren ise bakteriyel populasyon azalmış ve hücrelerde belirgin şekilde kahverengileşmeler ve ölümler tespit edilmiştir.

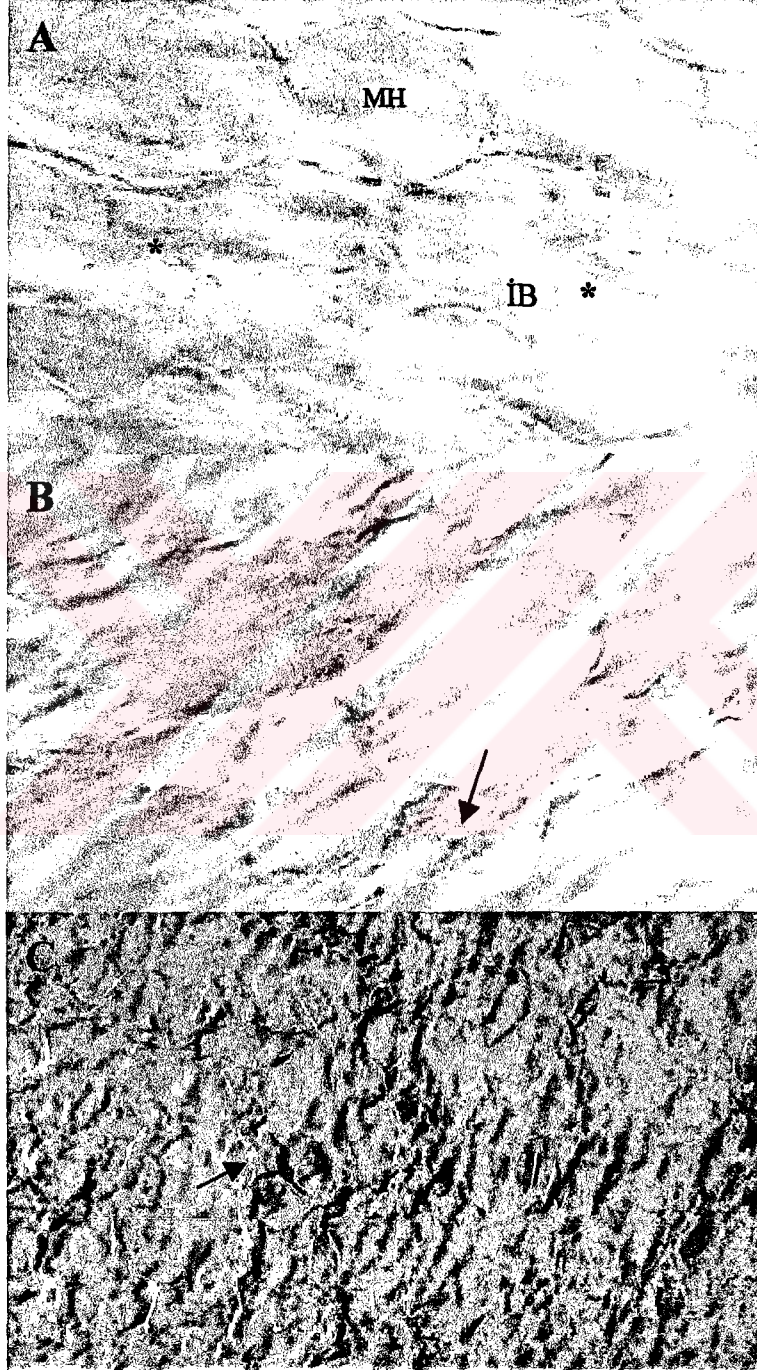
4.3.2. Kısmi Uyumsuz İlişki

Kısmi uyumsuz reaksiyon gösteren örneklerde inokulasyondan 24 saat sonra mezofil hücrelerinde kahverengileşmeler ve hücreler arası boşluklarda bakteriyel koloniler tespit edilmiştir (Şekil 4.6). İnokulasyondan 48 saat sonra bakteriyel kolonilerde azalma ve mezofil hücrelerinde daha yoğun kahverengileşmeler meydana gelmiştir. İnokulasyonun 4. gününden itibaren ise mezofil hücreler tamamen kahverengileşmiştir.

4.3.3. Uyumsuz İlişki

Uyumsuz reaksiyon gösteren hücrelerde inokulasyondan 24 saat sonra mezofil hücrelerde fenoliklerin birikiminden dolayı kahverengileşme ve ölümler, hücreler arası boşluklarda ise küçük bakteri kolonileri belirlenmiştir (Şekil 4.6). İnokulasyondan 48 saat sonra ise bu alanlardaki hücre ölümleri artarken bakteriyel kolonilerde azalmalar

meydana gelmiştir. Inokulasyonun 4. gününde hücreler arası boşluklarda bakteriyel koloni tespit edilememiştir.



Şekil 4.6. Yaprak inokulasyonundan 2 gün sonra duyarlı (A), orta düzeyde dayanıklı (B) ve dayanıklılığın gözlemlendiği yaprak hücrelerinde oluşan reaksiyonlar. Duyarlı reaksiyonda sağlam mezofil hücreler arasında büyük bakteri kolonileri görülmektedir(*). Orta düzeyde dayanıklı ve dayanıklı bitki hücrelerinde ölümler ve şekil bozuklukları ortaya çıkmıştır (ok). MH; mezofil hücre, İB; hücreler arası boşluk

4.4. Fasulye Çeşitlerinde *P. s. pv .phaseolicola* Irkları ile İnokulasyonu Takiben Oluşan Reaksiyonların Histokimyasal Boyamalarla Belirlenmesi

4.4.1. Lignin

Ligninin histokimyasal lokalizasyonu phloroglucinol/HCL (PGH) ile boyama tekniğiyle belirlenmiştir. Boyama sonucu ligninde bulunan cinnamylaldehyde gruplarıyla reaksiyona giren phloroglucinol reaksiyon noktalarında kırmızı-pembe renk vermektedir (VALLET ve ark. 1996). Kotiledon yaprakların bakteriyel süspansiyon ile (10^8 cfu/ml) inokulasyonunu takiben uyumlu ve uyumsuz reaksiyonlarda lignin birikimi açısından farklılıklar ortaya çıkmıştır. Özellikle dayanıklılığın meydana geldiği reaksiyonlarda yüksek oranda lignin biriktiği tespit edilmiştir. REIMER ve LEACH (1991), *Xanthomonas oryzae*'nın Xa-10 geni taşıyan ırkı ile inokule edilen pirinçlerde ırka spesifik dayanıklılığın oluşumuyla inokulasyon noktasında lignin birikimi arasında bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. Kontrol bitkilerde ise lignin yalnız ksilem borularında tespit edilmiştir.

4.4.1.1. Uyumlu İlişki

İnokulasyondan 12 saat sonra uyumlu reaksiyon görülen hücreler ile yapılan boyamalarda lignin birikimi tespit edilmemiştir. İnokulasyonun 24. saatinden itibaren nekrotik lekelerin etrafındaki ksilem borularında kontrol bitkilerinde olduğu gibi hafif bir boyama belirlenmiştir (Şekil 4.7).

4.4.1.2. Kısmi Uyumsuz İlişki

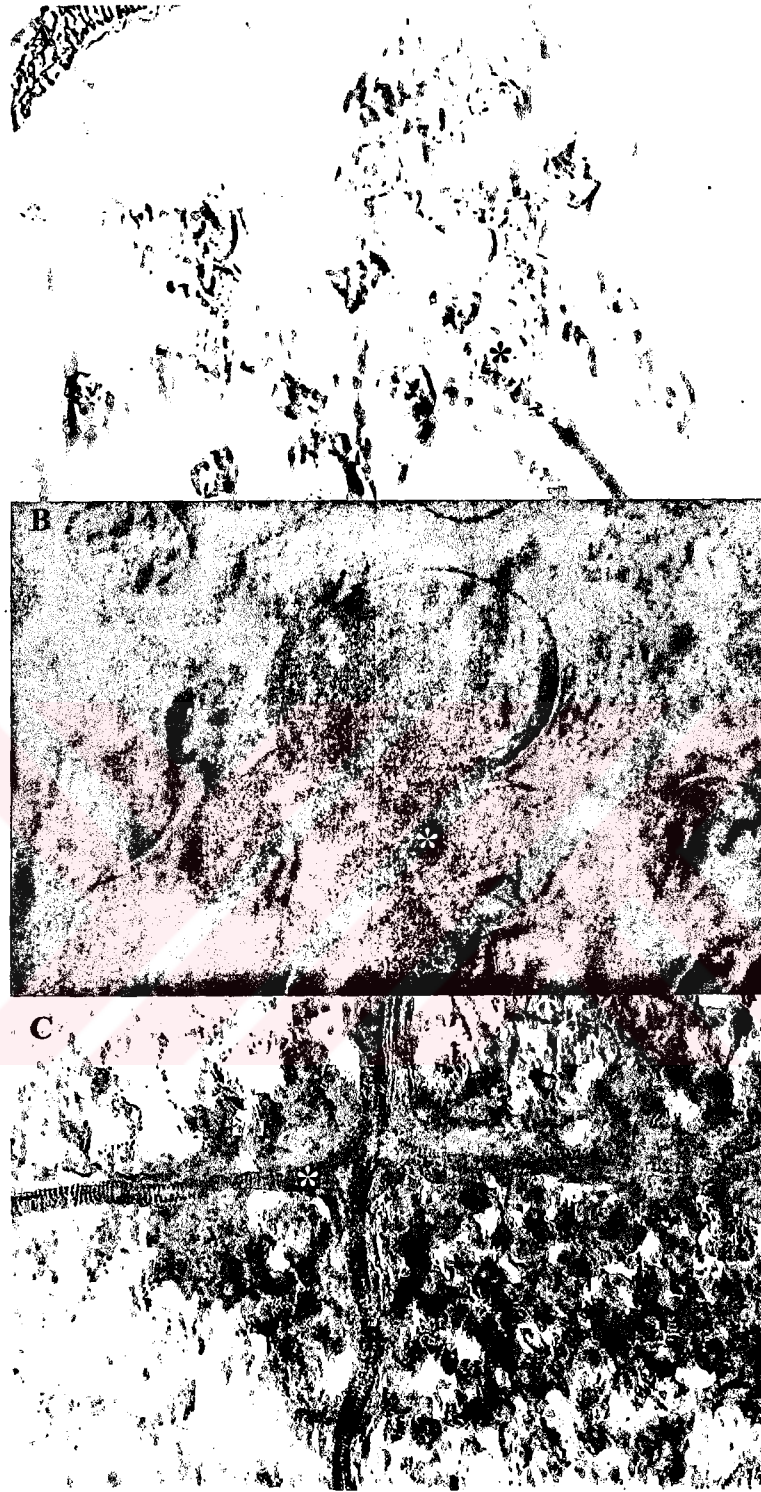
Kısmi uyumsuz ilişkide ilk lignin birikimi inokulasyondan 24 saat sonra belirlenmiştir. İnokulasyondan 48 ve 72 saat sonra bu alanlarda lignin birikiminden dolayı boyama şiddeti artarken 96. saatten itibaren boyama şiddetinde azalmalar tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

4.4.1.3. Uyumsuz İlişki

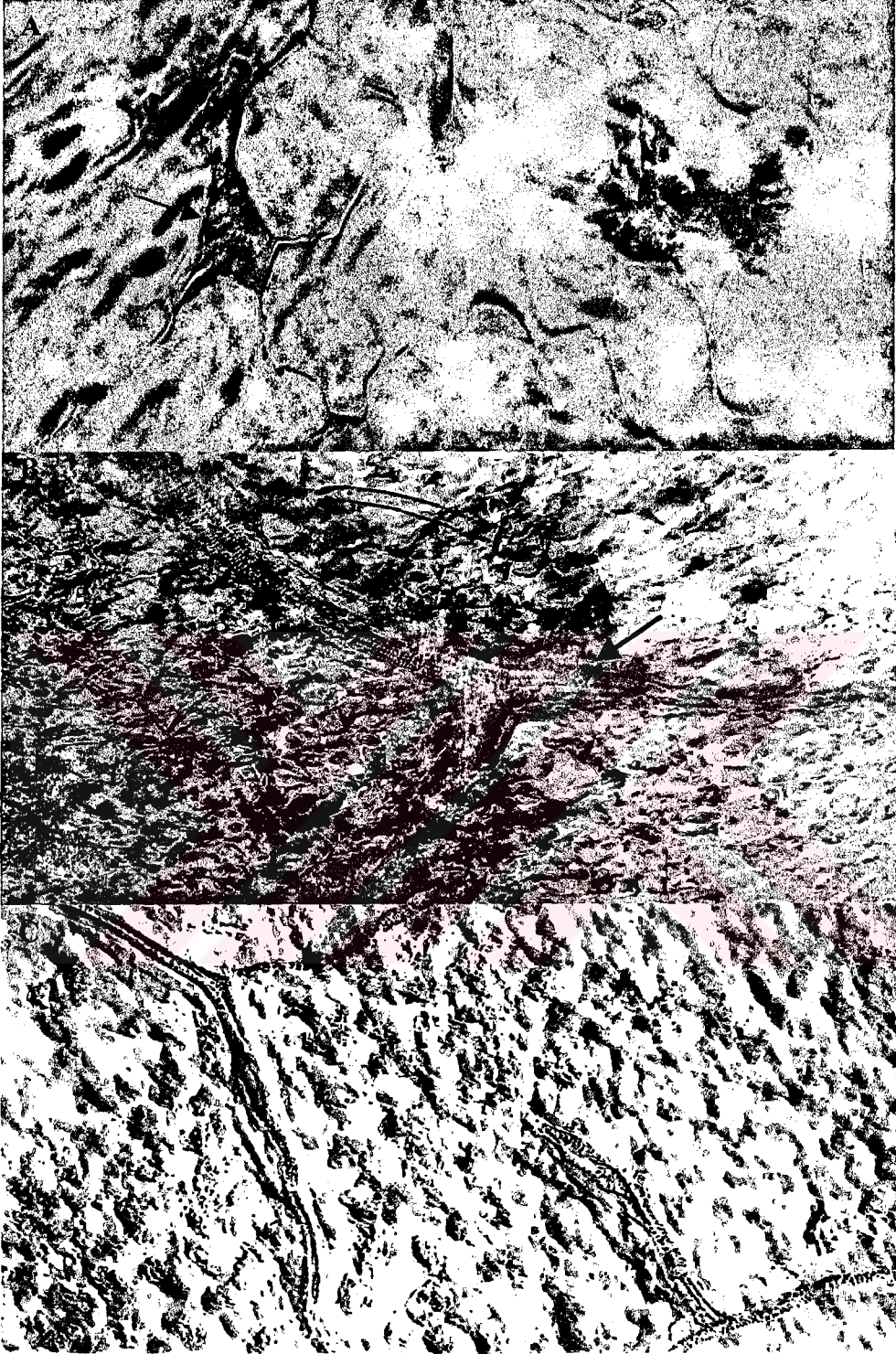
Uyumsuz reaksiyonda lignin ilk olarak inokulasyondan 12 saat sonra belirlenmiştir. Boyama sonucu HR gösteren hücreler ve bu hücrelerin etrafındaki damarlarda yoğun bir lignin birikimi tespit edilmiştir (Şekil 4.8). İnokulasyondan 24 saat sonra boyama şiddeti artmış fakat 48. saatten itibaren HR sonucu hücre ölümleri artmasına rağmen boyamanın şiddetinde azalmalar meydana gelmiştir (Şekil 4.9). Yapılan birçok konukçu patojen reaksiyonu çalışmalarında benzer sonuçlar bildirilmiştir. SOYLU (1999), reaksiyon noktalarında oluşan yoğun fenolik birikiminin bu noktalarda önceden oluşan ligninin kimyasal yapısını okside etmesi sonucu bu yapıları tanıyan phloroglucinol'un reaksiyon vermesini engelleyebileceğini bildirmiştir. Vance ve ark. (1980), cinnamylaldehyde grubunun bitki veya patojen kökenli bileşikler tarafından oksidasyona uğratılması sonucu yapısının indirgenip syringyl lignine dönüşmesi sonucu histokimyasal boyamanın zayıf reaksiyon vermesine neden olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.7. Uyumlu reaksiyonun görüldüğü bitki hücrelerinde inokulasyondan 24 (A),48 (B) ve 72 (C) saat sonra hücre duvarlarında lignin birikimi ve boyama



Şekil 4.8. Kısmi uyumsuz reaksiyonun görüldüğü bitki hücrelerinde inokulasyondan 24(A), 48 (B) ve 72 (C) saat sonra hücre duvarlarında lignin birikimi ve boyama



Şekil 4.9. Uyumsuz reaksiyonun görüldüğü bitki hücrelerinde inokulasyondan 24 (A),48 (B) ve 72 (C) saat sonra hücre duvarlarında lignin birikimi ve boyama. Lignin özellikle ölmekte olan hücreler ve iletim demetlerinde lokalize olmuştur (ok)

4.4.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Inokulasyon noktalarında biriken H₂O₂'nin tespiti için DAB boyama tekniği kullanılmıştır. Boyama sonucu H₂O₂ biriken bölgeler kahverengileşmiştir. Uyumlu, uyumsuz ve kısmi uyumsuz reaksiyonlarda boyamanın şiddeti ve zamanı arasında farklılıklar oluşmuştur (Çizelge 4.2). inokule edilmemiş kontrol bitkilerinde H₂O₂ yalnız ksilem borularında tespit edilmiştir. Benzer şekilde BESTWICK ve ark. (1997), *P. s. pv. phaseolicola* ile inokule edilen marul yapraklarında inokulasyon alanına komşu hücrelerde yüksek oranda H₂O₂ biriktiğini, inokul edilmemiş bitkilerde ise H₂O₂'nin yalnız ksilem damarlarında biriktiğini bildirmiştir.

4.4.2.1. Uyumlu İlişki

Uyumlu reaksiyonda boyamadan 12 saat sonra herhangi bir boyama görülmezken 24 saat sonraki incelemelerde kontrol bitkilerinde olduğu gibi yalnız iletim demetlerinde hafif kahverengileşmeler tespit edilmiştir. Inokulasyondan 48-72 saat sonra bu bölgelerdeki hücrelerin ölmeye başlamasından dolayı mezofil hücrelerinde hafif kahverengileşmeler belirlenmiştir (Şekil 4.10).

4.4.2.2. Kısmi Uyumsuz İlişki

Kısmi uyumsuz reaksiyonlarda inokulasyondan 12 sat sonra mezofil hücrelerinde kahverengileşmeler belirlenirken inokulasyon bölgesine komşu mezofil hücrelerinde ise boyama tespit edilememiştir. Inokulasyondan 24 saat sonra boyamanın şiddeti artmaya başlamış ve en yoğun boyama 72. saatte tespit edilmiştir. Inokulasyonun 96. saatinden itibaren bu bölgedeki mezofil hücrelerinde boyama şiddeti azalırken komşu mezofil hücrelerde ise boyama şiddetinde artışlar başlamıştır (Şekil 4.11).

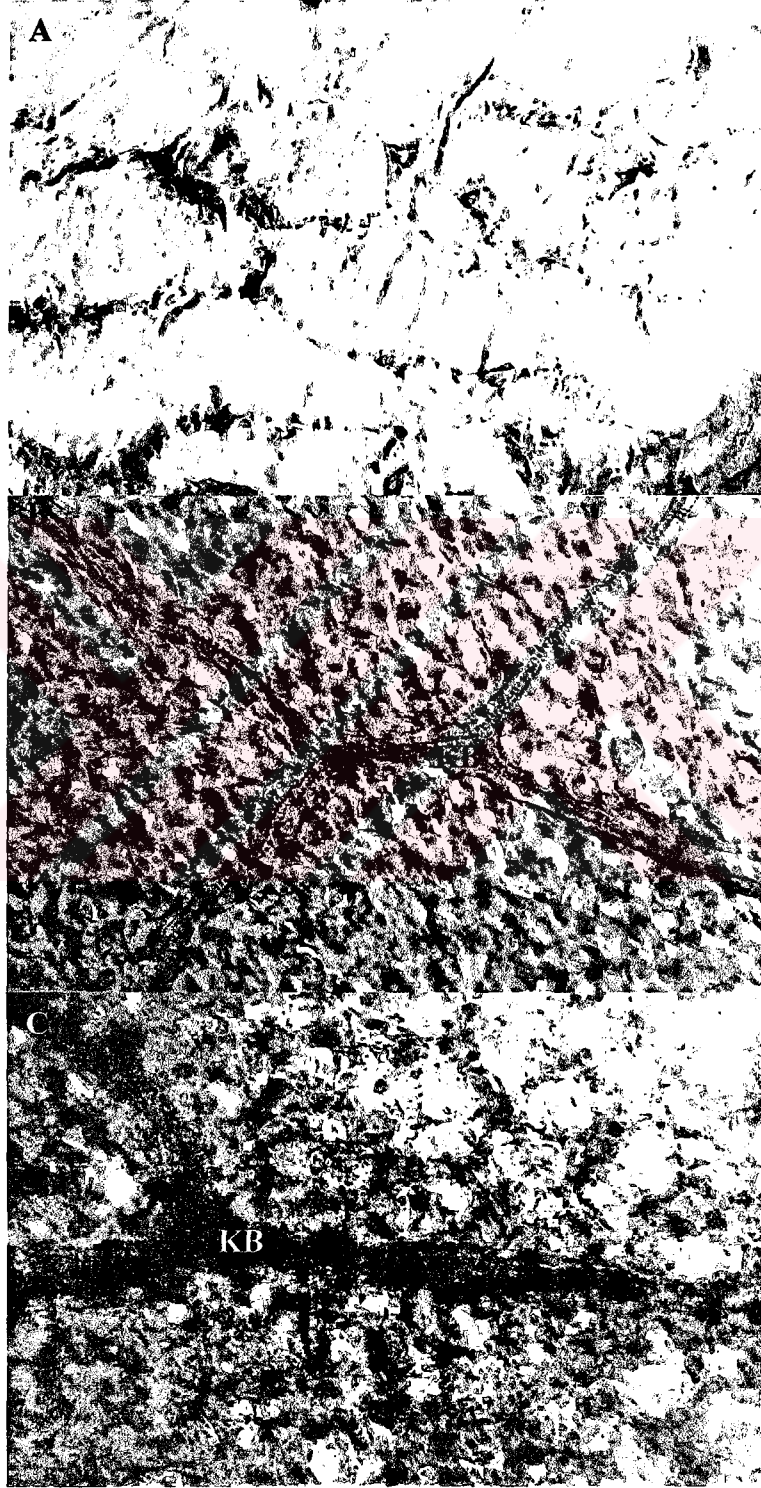
4.4.2.3. Uyumsuz İlişki

Kotiledon yaprakların virülent ırkla inokulasyonundan 12 saat sonra infekteli bölgedeki mezofil hücrelerinde H₂O₂ birikiminden dolayı kahverengileşmeler

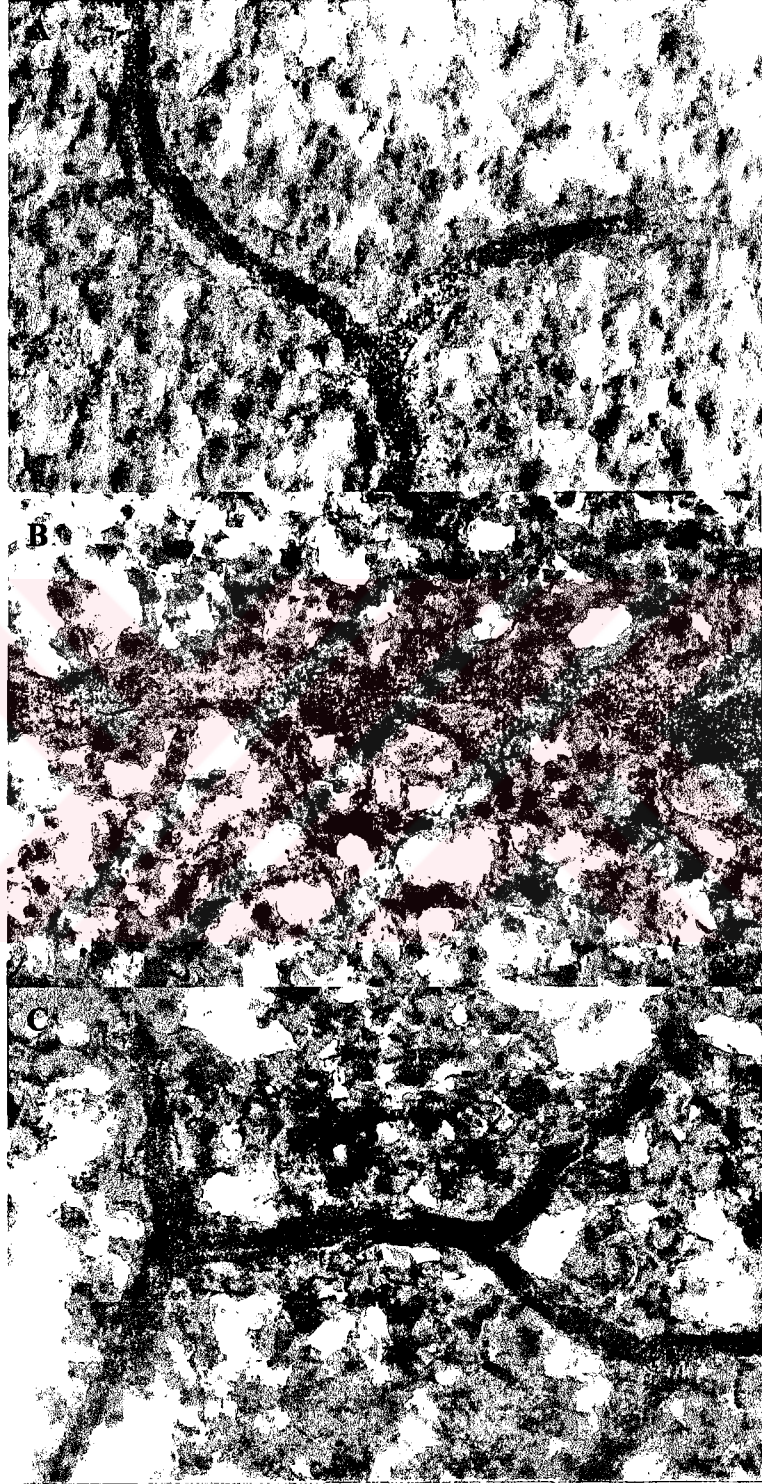
belirlenmiştir. İnokulasyon bölgesine komşu hücrelerde yalnız iletim demetlerinde boyama tespit edilmiştir. İnokulasyondan 24 ve 48 saat sonra infekteli alanlardaki mezofil hücrelerinde çok yoğun boyama tespit edilirken inokule edilen bölgeye komşu mezofil hücrelerinde ise düşük yoğunlukta bir boyama belirlenmiştir(Şekil 4.12) İnokulasyondan 72 ve 96 saat sonra ise inokulasyon bölgesinde boyamanın şiddeti azalırken bu bölgelere komşu hücrelerde yoğun bir boyama tespit edilmiştir(Şekil 4.12).

Çizelge 4.2. İA: infekteli alan. UA: infeksiyon noktasının uzağındaki hücreler, BOR:infeksiyon bölgesinin sınırındaki hücreler. + ve - boyamanın şiddetini belirlemektedir. -; boyama yok, ±; yalnız iletim demetlerinde hafif kahverengileşme, mezofil hücrelerinde çok hafif kahverengileşme ve iletim demetlerinde kahverengileşme, ++; mezofil hücrelerinde kahverengileşme, +++; mezofil hücrelerinde koyu kahverengileşmeler, ++++ tüm hücrelerde çok şiddetli kahverengileşme

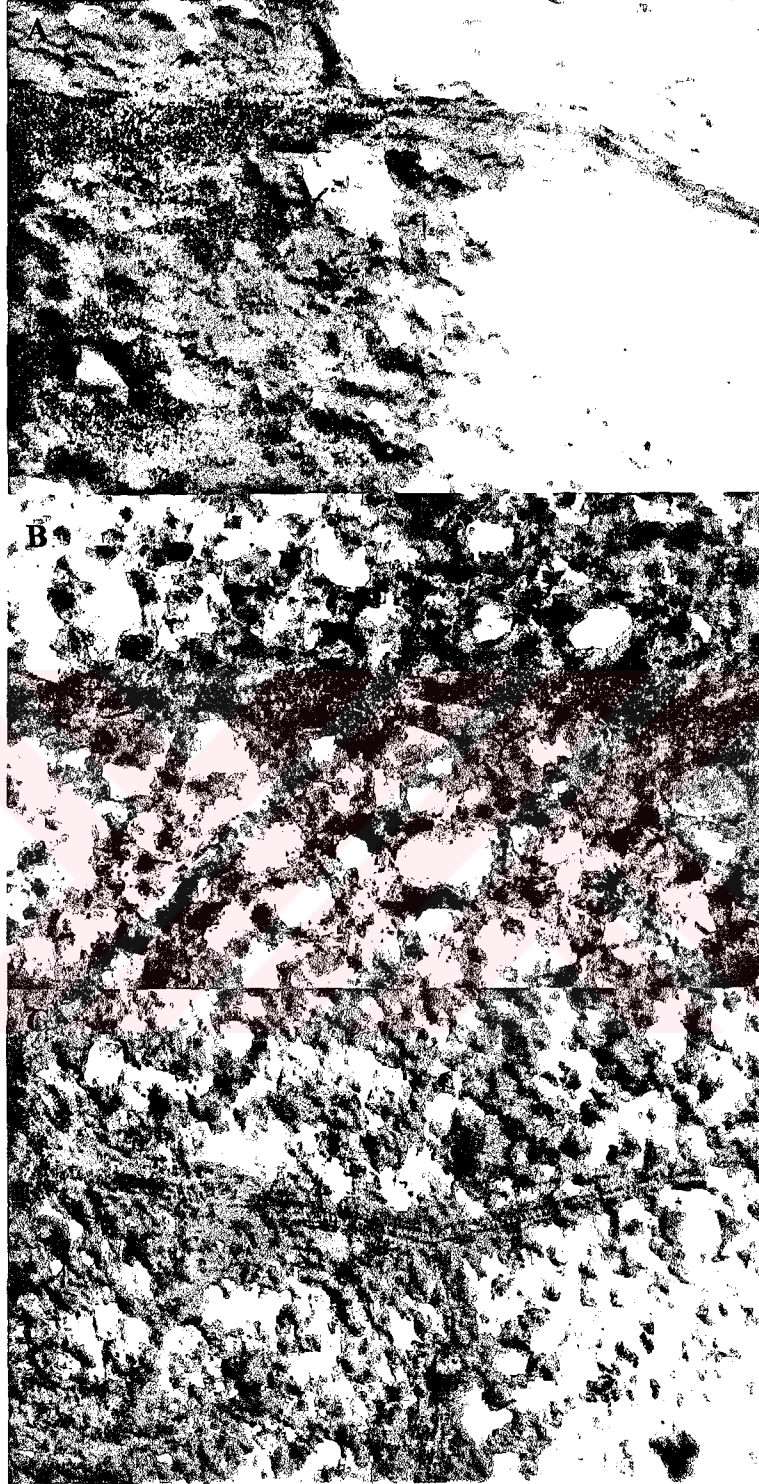
		12	24	48	72	96
R	İA	++	++++	++++	+++	++
	UA	±	+	+	+	++
	BOR	+	++	++	+++	++++
M	İA	+	++	+++	++++	+++
	UA	-	-	±	±	+
	BOR	-	±	+	++	+++
S	İA	-	±	++	++	+++
	UA	-	-	-	±	±
	BOR	-	-	+	++	++



Şekil 4.10. Uyumlu reaksiyonun görüldüğü bitki hücrelerinde inokulasyondan 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat sonra H_2O_2 birikimi ve boyama. KB, ksilem boruları



Şekil 4.11. Kısmi uyumsuz reaksiyonun görüldüğü bitki hücrelerinde inokulasyondan 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat sonra H₂O₂ birikimi ve boyama



Şekil 4.12. Uyumsuz reaksiyonun görüldüğü bitki hücrelerinde inokulasyondan 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat sonra H₂O₂ birikimi ve boyama. A; H₂O₂ birikiminin infekteli alanda yoğunlaştığını göstermektedir (*)

4.5. Kalloz

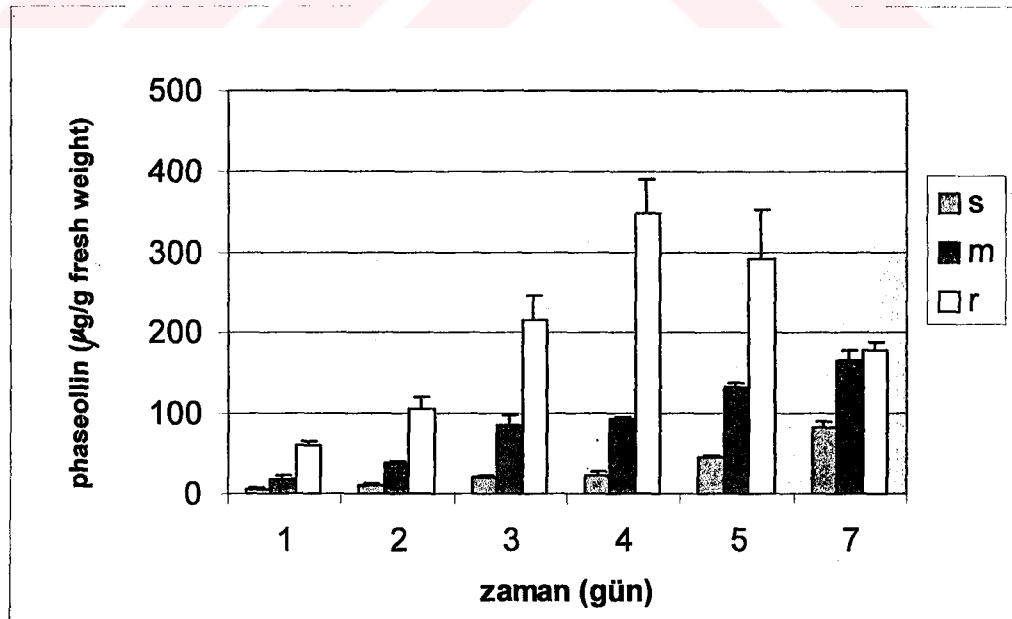
P. s. pv phaseolicola'nın virü lent ve avirülen ırkları ile inokulasyonu takiben anilin blue ile boyanan ve uyumsuz ilişkinin gözle ndiği yapraklar ışık mikroskopu ile incelendiğinde hücre duvarında kalloz benzeri oluşumların meydana geldiği tespit edilmiştir. Anilin blue ile boyanan kallozun otofluoresans özellik göstererek UV ışıklı mikroskop altında incelendiğinde parlak bir şekilde görüldüğü birçok araştırmada bildirilmiştir. SOYLU ve ark. (1998) *Peronospora parasitica* ile inokule edilen *Arabidopsis thalina*'nın özellikle kısmi uyumsuzluk görülen reaksiyonlarda haustoryumların etrafında yuvarlak şekilde kalloz oluştuğunu ve UV ışık altında oldukça parlak otofluoresans gösterdiğini bildirmiştir. SOYLU (1998) kalloz ve peroxidase yoğunluğunun *P. s. pv. phaseolicola*'nın avirülen ırkı (avrPpiA) ile inokule edilen dokularda inokule edilmemiş yapraklardan veya *P. s. pv. tomato*'nun virü lent ırkı (DC3000) ile inokule edilen dokulardan daha fazla olduğunu bildirmiştir.



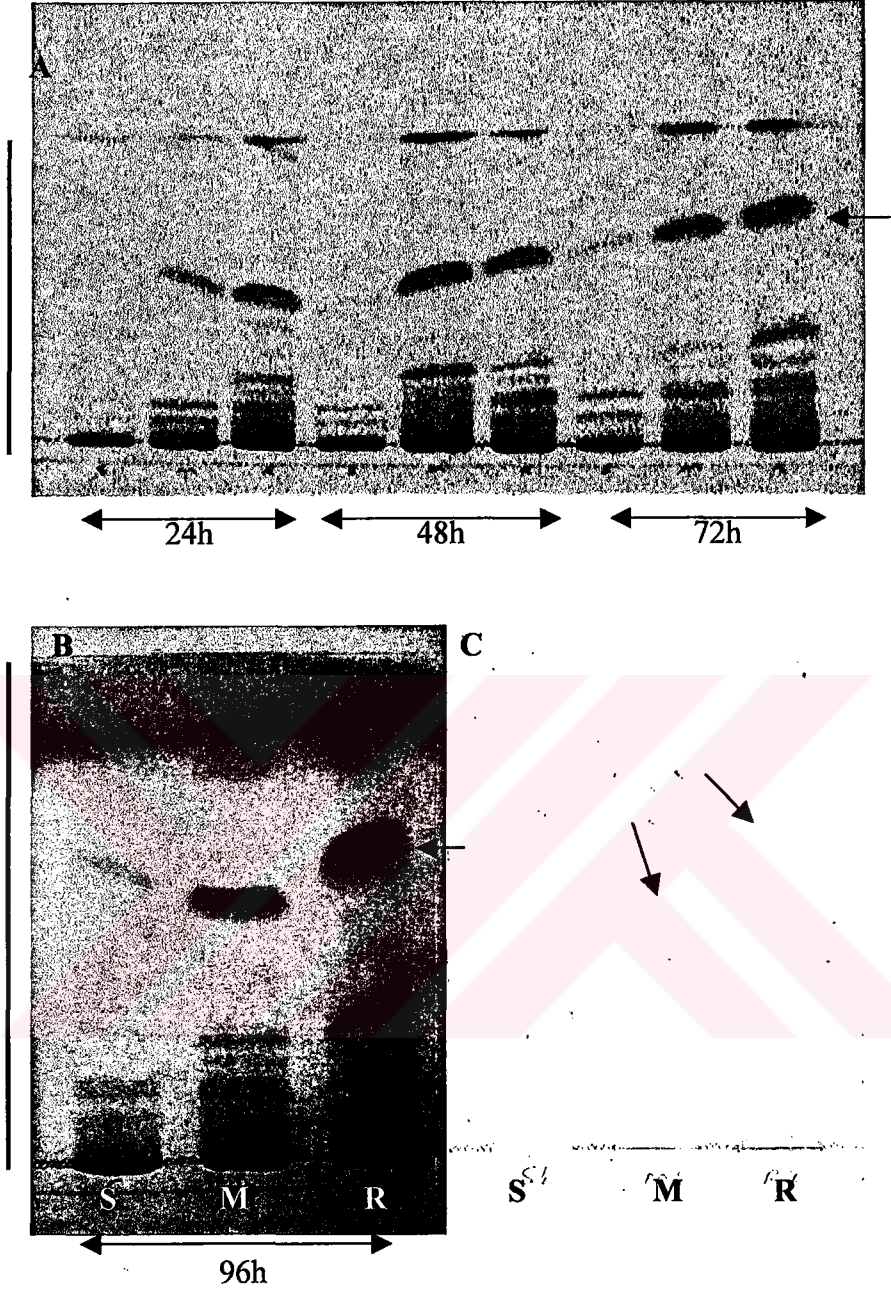
Şekil 4.13. Uyumsuz ilişkinin görüldüğü mezofil hücre duvarlarında kalloz birikimi

4.6. Fitoaleksin Birikimi

P. s. pv. phaseolicola'nın duyarlı, orta düzeyde duyarlı ve dayanıklı reaksiyon gösteren ırkları ile inokule edilen kapsüller bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi ekstrakte edilmiş ve TLC tabakalarına yüklenerek içerisinde uygun solvent bulunan tank içerisinde phytoalexin bantlarının oluşumu sağlanmıştır. TLC plakaları UV (254) ışık altında incelendiğine zamana ve ırk-çeşit reaksiyonuna bağlı olarak hem bant oluşumu açısından (Şekil 4.15 A,B) hem de $\mu\text{g/g}$ yaş ağırlıktaki bitki dokusunda biriken fitoaleksin miktarında (Şekil 4.14) farklılıklar oluşmuştur. Özellikle duyarlı reaksiyon gösteren ve inokulasyonun 5. gününden itibaren kahverengileşmelerin görüldüğü kapsüllerde 5. ve 7. günde fitoaleksin miktarında artış olduğu görülmüştür. Yapılan gözlemlerde inokule edilen kapsüllerde oluşan kahverengileşmenin şiddeti ile fitoaleksin birikimi arasında doğru orantı olduğu belirlenmiştir. Fitoaleksinlerin antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla TLC plakaları üzerine, patates dextrose (agarsız) içerisinde hazırlanan spor süspansiyonu püskürtülmüş ve bu plakalar inkübasyona bırakıldıktan sonra incelendiğinde phaseollin bantlarının bulunduğu yerlerde fungusun gelişemediği ve buralarda bir inhibisyon zonu oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15 C).



Şekil 4.14. Pph'nin farklı ırkları ile inokule edilen Şehirli-90 fasulye çeşidinde fitoaleksin birikimi



Şekil 4.15. Kapsül inokulasyonu sonucu çeşit-ırk reaksiyonuna ve zaman bağlı olarak TLC plakalarında oluşan phaseollin bantlarının (ok) 254nm dalga boylu UV ışık altında görünüşleri (A,B). C. Üzerine fungus sporu püskürtülen TLC plakasında phaseollin bulunan yerlerde oluşan inhibisyon zonu. S; Duyarlı, M; orta düzeyde dayanıklı, R; dayanıklı

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, farklı fasulye çeşitlerinin fasulye hale yanıklığı etmeni *P. s. pv. phaseolicola*'ya karşı göstermiş olduğu reaksiyonlar ve çeşit ırk spesifitesi belirlenmiştir.

Konukçu patojen reaksiyonlarının makroskobik olarak belirlenmesi bakteri ırkları ile inokule edilen kapsüllerde oluşan reaksiyonlara göre yapılmıştır. Fasulye çeşitleri arasında Roma-II, Efequen ve Cilena'nın 1. ırk dışındaki tüm bakteri ırklarına karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Efequen ve Cilena çeşitleri 1, Gina, Yunus-90 ve Magnum çeşitleri 2, Şehirali-90, Karacaşehir-90 ve Şekerli çeşitleri 3, Ayşe kadın ve Göynük-98 çeşitleri ise 4 bakteri ırkına karşı dayanıklılık gösterirken Roma-II, Yunus-90, Göynük-98 ve Şekerli çeşitleri 1, Şehirali-90 ve Ayşe kadın çeşitleri 2, Karacaşehir-90 çeşiti 3 bakteri ırkına karşı orta derecede dayanıklılık göstermiştir. Bakterinin 6, 8 ve 9. ırklarının testlenen tüm fasulye çeşitlerinde virulent olduğu tespit edilmiştir. Değerlendirmeler reaksiyonların bariz bir şekilde birbirinden ayrıldığı infeksiyonun 4. gününde yapılmıştır.

İnokulasyonu takiben kapsüller üzerinde infeksiyonun ilk dönemlerinde ıslaklık oluşumu ve sonraları bu alanlarda bakteriyel eksudat oluşumu uyumlu ilişki olarak kabul edilmiş, bu simptomları gösteren çeşitler duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Uyumsuz ilişkinin görüldüğü dayanıklı bitki kapsüllerinde ise ilk dönemlerde ıslaklık şeklinde başlayan simptomlar inokulasyonun 2. gününden itibaren kahverengileşmeye başlamış ve bu alanlarda doku çökmeleri başlamıştır. Kısmi uyumsuzluğun görüldüğü kapsüllerde inokulasyonun ilk dönemlerinde ıslaklık oluşurken 2. günden itibaren bu ıslak alanların etrafında kahverengileşmeler meydana gelmiştir ıslaklık simptomları bu alan içerisinde sınırlandırılmıştır. Duyarlı reaksiyonlarda ise özellikle inokulasyonun 5. gününden itibaren ıslaklık şiddeti iyice artmış ve tüm meyve bakteri ile enfekte olmuştur.

Uyumlu reaksiyonun gözlemlendiği bazı çeşitlerde ilginç bir şekilde inokulasyonun ilk 4 gününde ıslaklık simptomlarının görüldüğü alanlarda 5. günden itibaren kahverengileşmeler meydana gelmiştir. Bunun sebebinin bu tür bitkilerde bulunan ve hastalığa karşı dayanıklılığı sağlayan genlerin resesif karakterde olabileceği, bu nedenle dayanıklılığın gelişmesi için belirli bir süreye ihtiyaç duyulabileceği düşünülmektedir.

Nitekim fitoaleksinin çalışmalarında bu tip reaksiyon gösteren kapsüllerde 5. günden itibaren fitoaleksinin miktarında da artış olduğu belirlenmiştir.

Yaprak inokulasyonlarında ise uyumlu ilişkide ilk makroskopik belirtiler inokulasyondan 24 saat sonra ıslaklık oluşumu ile karakterize edilmiştir. İnokulasyonun 4. gününden itibaren bu alanların etrafı sarı bir hale ile çevrilmiştir. Sonraki dönemlerde ise tüm yapraklar sararak dökülmüştür. Uyumsuz ilişkinin gözlemlendiği dayanıklı bitki yapraklarında inokulasyondan 12 saat sonra ilk makroskopik belirtiler gözlemlenmiştir. 24 saat sonra ise yaprak üst yüzeyinde camlaşma olarak adlandırılan parlamalar ve kurumalar, yaprak alt yüzeyindeki damarlarda fenolik birikiminden olabileceği düşünülen kahverengileşmeler gözlemlenmiştir.

İnokule edilen yaprak hücreleri histokimyasal boyalarla boyanıp mikroskop altında incelendiğinde özellikle uyumsuz ilişkinin meydana geldiği dayanıklı reaksiyonlarda bitki hücrelerinde kalloz, lignin ve H₂O₂ gibi dayanıklılıkta rol oynayan bileşiklerin yüksek oranda biriktiği tespit edilmiştir.

Fitoaleksinin çalışmalarında uyumsuz ilişkinin gözlemlendiği kapsüllerde uyumlu ilişkiye oranla daha yüksek oranda fitoaleksinin (phaseollin) birikimi belirlenmiştir. TLC plakalarında uygun solvent içerisinde geliştirildikten sonra bu plakalar üzerine *Botrytis cinerea* sporları püskürtüldüğünde fitoaleksinin bantlarının olduğu yerlerde fungusun gelişemeyip inhibisyon zonu oluşması dayanıklılık sonucu oluşan fitoaleksinin antimikrobiyal bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

Uyumlu ve uyumsuz ilişkide bakteriyel çoğalma açısından büyük farklılıklar meydana gelmiştir. Uyumlu ilişkide inokulasyondan 48 saat sonra bakteri popülasyonu 500 kat artarken, uyumsuz ilişkide inokulasyondan 24 saat sonra popülasyon 4 kat artmış ve daha sonra bakteriyel popülasyonda azalma meydana gelmiştir. Uyumlu ilişkide ise bakteriyel popülasyon inokulasyonun 72. saatinden itibaren azalmaya başlamıştır. Uyumsuz ilişkinin gözlemlendiği dayanıklı bitkilerde dayanıklılığın bir göstergesi olan HR sonucu bitki hücrelerinin aniden ölmesi ve bu hücrelerde biriken antimikrobiyal maddelerin etkilerinden dolayı bakteriyel çoğalmanın erken dönemde engellendiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada fasulye çeşitleri ile *P. s. pv. syringae* arasındaki konukçu-patojen ilişkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların ışığında fasulye üretimi yapılan ve *P. s. pv. phaseolicola*'nın sorun olduğu bölgelerde dayanıklı çeşitler

ile verimi yüksek duyarlı çeşitler arasında yapılacak ıslah çalışmaları ile hem hastalığa dayanıklı hem de verimi yüksek çeşitler elde edilebilir.



4. KAYNAKLAR

- ABE, K., FUJIKAWA, E., TAKEUCHI, Y., TAKADA, Y. and YAMAKO, A., 2002. The possibility of factors other than phytoalexin accumulation preventing fungal growth the incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. **Plant pathology**, 51: 237-241.
- ALFANO, J. R., and COLLMER, A., 1996. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. **The Plant Cell**, 8: 1683-1698.
- ANONİM, 2000. Tarımsal Yapı. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistikleri Enstitüsü
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F., AND LOW, P.S., 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology**, 90:109-116.
- ATKINSON, M.M., 1993. Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. **Advances in Plant Pathology**, 10: 35-64.
- BAKER, C.J., MOCK, N., GLAZENER, J. and ORLANDI, E., 1993. Recognition responses in pathogen/non-host and race/cultivar interactions involving soybean (*Glycine max*) and *Pseudomonas syringae* pathovars. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 43: 81-94.
- BAILEY J. A., BURDEN, R. S., 1973. Biochemical changes and phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following cellular browning caused by tobacco necrosis virus. **Physiological Plant Pathology**, 3:171-177.
- BENHAMOU, N., 1992. Ultrastructural detection of β -1,3-glucans in tobacco root tissues infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* using a gold-complexed tobacco β -1,3-glucanase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 41: 351-370.
- BENHAMOU, N., MAZAU, D., GRENIER, J. and ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T., 1991. Time-course study of the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in root cells of susceptible and resistant tomato plants infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. **Planta**, 184: 196-208.
- BENLİOĞLU, K., ÖZAKMAN, M. ve ÖNCELER, Z., 1994. Bacterial blights of beans in Türkiye and resistance to halo blight and common blight. **9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası-Aydın**, 574-550.
- BENNETT, M.H., GALLAGHER, M.D.S., BESTWICK, C.S, ROSSITER, J.T. and MANSFIELD, J.W., 1994. The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 44:321-333.
- BENNETT, R. N., and WALLSGROVE, R. M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytology**, 127: 617-633.
- BESTWICK, C.S., BENNETT, M.H. and MANSFIELD, J.W., 1995. Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. **Plant Physiology**, 108: 503-516.
- BESTWICK, C.S., BROWN, I.R., BENNETT, M.H. and MANSFIELD, J.W., 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **The Plant Cell**, 9: 209-221.

- BRADLEY, D.J., KJELLBOM, P. and LAMB, C., 1992. Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell*, 70: 21-30.
- BROWN, I. and MANSFIELD, J.W., 1991. Interactions between *Pseudomonads* and *Phaseolus vulgaris*. In: **Electron microscopy of plant pathogens**. K.Mendgen and D.E.Lesemann, Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 185-196.
- BROWN, I., MANSFIELD, J., and BONAS, U., 1995. *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papilla deposition in pepper mesophyll cells. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 8: 825-836.
- BRUCE, R.J., and WEST, C.A., 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology*, 91: 889-897.
- CHEN, Z., SILVA, R., and KLESSING, D. 1993. Involvement of reactive oxygen species in the induction of systemic acquired resistance by salicylic acid in plants. *Science*, 262: 1883-1886.
- CRUTE, I. R., DE WIT, P. J. G. M., WADE, M. 1985. Mechanisms by which genetically controlled resistance and virulence influence host colonization by fungal and bacterial parasites. In: **Mechanisms of Resistance to Plant Disease**. Fraser, R. S. S., Ed. Martinus Nijhoff and W. Junk, Dordrecht, The Netherlands. pp. 143-309.
- DAI, G.H., NICOLE, M., ANDARY, C., MARTINEZ, C., BRESSON, E., BOHER, B., DANIEL, J.F. and GEIGER, J.P., 1996. Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 285-306.
- DANGL, J. L., DIETRICH, R. and RICHBERG, M. H., 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, 8: 1793-1807.
- DE WIT, P. J. G. M., 1995. Fungal avirulence genes and plant resistance genes: Unravelling the molecular basis of gene-for-gene interactions. *Advances in Botanical Research*, 21: 147-185.
- DIETRICH, R.A., DELANEY, T.P., UKNES, S.J, WARD, E.R., RYALS, J.A. and DANGL, J.L., 1994. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 77: 565-577.
- DIXON, R.A., and HARRISON, M.J., 1990. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, 28: 165-234.
- DIXON, R.A., and LAMB, C.J., 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology*, 41: 339-367.
- DOKE, N., 1983. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology*, 23: 359-367.

- DOKE, N. and OHASHI, Y., 1988. Involvement of an O_2^- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 32: 163-175.
- EBEL, J., and COSIO, E.G., 1994. Elicitors of plant defense responses. **International Review of Cytology**, 148: 1-36.
- FETT, W.F., and JONES, S.B., 1995. Microscopy of the interaction of *hrp* mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* with nonhost plant. **Plant Science**, 107: 27-39.
- FILLINGHAM, A.J., WOOD, J., BEVAN, J.R., CRUTE, I.R., MANSFIELD, J.W., TAYLOR, J.D. and VIVIAN, A. 1992. Avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pathovars *phaseolicola* and *pisi* confer specificity towards both host and non-host species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 40: 1-15.
- FOURIE, D., 1998. Characterization of halo blight races on dry bean in South Africa. **Plant Disease**, 82: 307-310
- GNANAMANICKAM, S.S. and PATIL, S.S., 1977. Accumulation of antibacterial isoflavonoids in hypersensitively responding bean leaf tissues inoculated with *Pseudomonas phaseolicola*. **Physiological Plant Pathology**. 10:159-168.
- GÜNDÜZ, B., 2000. Bazı fasulye çeşitlerinin Antakya koşullarında farklı ekim zamanlarının verim ve bitkisel özelliklerine etkisi üzerine bir araştırma. **Yüksek Lisans Tezi**. 68s
- HAHLBROCK, K., and SCHEEL, D., 1989. Physiology and molecular biology of phenyl-propanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 40: 347-369.
- HALE C.N. and TAYLOR J.D., 1973 Races of *Pseudomonas phaseolicola* causing halo blight of beans in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research** 16 : 147-149
- HARPER, S., ZEWDIE, N., BROWN, I.R., and MANSFIELD, J.W., 1987. Histological, physiological and genetical studies of the responses of leaves and pods of *Phaseolus vulgaris* to the three races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and to *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 31: 153-172.
- HENDSON, M., HILDEBRAND, D.C. and SCHROTH, M.N., 1992. Relatedness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *antirrhini*. **Journal of Applied Bacteriology**, 73: 455-464.
- HITCHIN, F.E., JENNER, C.E., HARPER, S., MANSFIELD, J.W., BARBER, C.E. and DANIELS, M.J., 1989. Determinant of cultivar-specific avirulence cloned from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* race 3. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 34: 309-322.
- JENNER, C., HITCHIN, E., MANSFIELD, J., WALTERS, K., BETTERRIDGE, P., TEVERSON, D. and TAYLOR, J., 1991. Gene for gene interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Phaseolus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 4: 553-562.
- JOOSTEN, M. H. A. J., and DE WIT, P. J. G. M. 1989. Identification of several pathogenesis related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulvum*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. **Plant Physiology**, 89: 945-951.

- KARAKAYA, A. ve ÖZCAN, S., 2001 Susceptibility of Different Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. **Turkish Journal Of Biology**, 25:447-452
- KEEN, N.T. and LITTLEFIELD, L.J., 1979. The possible association of phytoalexins with resistance gene expression in flax to *Melampsora lini*. **Physiological Plant Pathology**, 14: 265-280.
- KEEN, N.T., 1992. The molecular biology of disease resistance. **Plant Molecular Biology**, 19: 109-122.
- KING, E.O., WARD, M.K. and RANEY, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 44: 301-307.
- KLEMENT, Z. 1982. Hypersensitivity. *In*: Phytopathogenic prokaryotes. MS Mount and GH Lacy, Eds. **Academic Press, New York**. pp. 149-177.
- LATUNDE-DADA, A. O., O'CONNEL, R. J., BOYWER, P. and LUCAS, J. A., 1999. cultivar resistance to antracnose disease of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) caused by *Colletotrichum destructivum* O'Gara. **European Journal of Plant Pathology**, 105:445-451.
- LEACH, J.E., AND WHITE, F.F., 1996. Bacterial avirulence genes. **Annual Review of Phytopathology**, 34: 153-179.
- LEVINE, A., PENNEL, R.I., ALVAREZ, M.E., PALMER, R. and LAMB, C., 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. **Current Biology**, 6: 427-437.
- LONG, M., BARTON-WILLIS, P., STASKAWICZ, B.J., DAHLBECK, D. and KEEN, N. T., 1985. Further Studies on the Relationship between Glyceollin Accumulation and the Resistance of Sobebean Leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Phytopathology**, 75-235:235-239.
- MANSFIELD, J.W. and RICHARDSON, A. 1981. Ultrastructure of interactions between *Botrytis* species and broad bean leaves. **Physiological Plant Pathology**, 19: 41-48.
- MANSFIELD, J.W. 1982. The role of phytoalexins in disease resistance. *In*: **Phytoalexins**. JA Bailey, JW Mansfield, Eds. Blackie, Glasgow. pp. 253-288.
- MANSFIELD, J. W., 1983. Antimicrobial compounds. *In*: **Biochemical Plant Pathology**. J. A. Callow, Ed. John Wiley and Sons, Chichester. pp. 237-265.
- MANSFIELD, J.W. 1990. Recognition and response in plant/fungus interactions. *In*: **Recognition and response in plant-virus interactions**. R.S.S. Frasser, Ed. Springer-Verlag, Berlin. pp 31-52.
- MANSFIELD, J., JENNER, C., HOCKENHULL, R., BENNETT, M.A. and STEWART, R. 1994. Characterization of *avrPphE*, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-blight bacterium. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 7: 726-739.
- MEHDY, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, 70: 1128-1131.
- MEHDY, M.C., SHARMA, Y.K., SATHASIVAN, K. and BAYS, N.W. 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiologia Plantarum**, 98: 365-374.
- MILLER, J.H., 1972. Experiments in Molecular Genetics. **Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York**

- MILOSEVIC, N., SLUSERANKO, A. J., 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 49:143-158.
- NICHOLSON, R.L. and HAMMERSCHMIDT, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, 30: 369-389.
- O'BRIEN, T.P., and MCCULLY, M.E.. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. **Termarcorphi, Melbourne, Australia**.
- OLSON, P.D. and VARNER, J.E. 1993. Hydrogen peroxide and lignification. **The Plant Journal**, 4: 887-892.
- OSBOURN, A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **The Plant Cell**, 8: 1821-1831.
- PRYOR, T. 1987. The origin and structure of fungal disease resistance genes in plants. **Trends in Genetics**, 3: 157-161.
- REIMERS, P. J. and LEACH, J. E., 1991. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene Xa-10 in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 38: 39-55
- SALMOND, G. P. C. 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 32: 181-200.
- SCHÄFER, W. 1994. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. **Annual Review of Phytopathology**, 32: 461-477.
- SIGEE, D. C. and EPTON H. A. S., 1975. Ultrastructure of *Pseudomonas phaseolicola* in resistant and susceptible leaves of French bean. **Physiological Plant Pathology**, 6:29-34.
- SIGEE, D.C. and EPTON, H.A.S., 1976. Ultrastructural changes in resistant and susceptible varieties of *Phaseolus vulgaris* following artificial inoculation with *Pseudomonas phaseolicola*. **Physiological Plant Pathology**, 9:1-8.
- SIGEE, D. C., 1993. Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspect. **Cambridge University Press, 318s**.
- SKALAMERA, D., JIBODH, S. and HEATH, M.C., 1997. Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). **New Phytologist**, 136: 511-524.
- SMART, M.G., AIST, J.R. and ISRAEL, H.W. 1986. Structure and function of wall apposition. 1. General histochemistry of papillae in barley coleoptiles attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. **Canadian Journal of Botany**, 64: 793-801.
- SMITH, I.M., DUNEZ, J., LELLIOTT, R. A., PHILIPS, D.H. and ARCHER, S.A., 1986. **European Handbook of Plant Diseases**, 583 s.
- SOMSSICH, I.E., BOLLMAN, J., HAHLBROCK, K., KOMBRINK, E. and SCHULZ, W., 1989. Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. **Plant Molecular Biology**, 12: 227-234.
- SORIANO-RICHARDS, E., URIBE-SALAS, D. and IBARRA-BARREA, G., 1998. Phaseollidin stored in vacuoles and the phytoalexin response in bean. **Plant pathology**, 47: 480-485.
- SOUTHERTON, S.G., and DEVERALL, B.J., 1990. Histological and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 36:483-494.

- SOYLU, M., 1999. Mildiyö Etmeni (*Peronospora parasitica*) ve Konukçusu *Arabidopsis thaliana* Arasındaki İlişkilerin Sitokimyasal ve Histokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi. **Doktora Tezi**. 161s.
- SOYLU, S., 1998. Analysis of the Responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Albugo candida* and pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Doktora Tezi**. 232s.
- SOYLU, E. M., SOYLU, S., YEĞEN, O. ve MANSFIELD, J. 1998. Arabidopsis thaliana ve Peronospora parasitica arasındaki ilişkilerin ışık ve elektron mikroskop altında karşılaştırmalı analizleri. **Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, Ankara s.171**
- STAB, M.R. and EBEL, J., 1987. Effect of Ca⁺² on phytoalexin induced by fungal elicitors in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 257: 416-423.
- SUTHERLAND, M.W., 1991. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 39: 79-93.
- TAYLOR, J. D., TEVERSON, D. M., ALLEN, M.A. and PASTOR-CORRALES, M.A., 1996. Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. **Plant Pathology**, 45:469-478
- TENHAKEN, R., LEVINE, A., BRISSON, L.F., DIXON, R. and LAMB, C. 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 92: 4158-4163.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, ZIGUO., WEI, Y. and COLLINGE, D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plant. H₂O₂ accumulation in papilla and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, 11:1187-1194.
- VALLET, C., CHABBERT, B., CZANINSKI, Y. and MONTIES, B., 1996. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. **Annals of Botany**, 78: 625-632.
- VANCE, G.P., KIRK, T.K. and SHERWOOD, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 18: 259-288.
- WEINGART, H., ULLRICH H., GEIDER, K. and VOLKSCH, B., 2001. The role of ethylene production in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *glcinea* and *phaseolicola*. **Bacteriology**. 91:511-517
- WU, G., SHORTT, B.J., LAWRENCE, E.B., ELAINE, E.B., FITZSIMMONS, K.C. and SHAH, D.M., 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. **The Plant Cell**, 7: 1357-1368.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Gaziantep'in Nizip ilçesinde doğdum. İlk Orta ve Lise eğitimimi Nizip'te tamamladıktan sonra 1995 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nü kazandım. 1999 yılında bu bölümden mezun oldum ve aynı yıl M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünün açmış olduğu Araştırma Görevlisi sınavını kazanarak göreve başladım.

