

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HASSAS BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) SERİ82 ÇEŞİDİNDE SARI PAS
(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) ENFEKSİYONU GELİŞİMİNDE ROL ALAN
PROTEİNLERİN PROTEOMİK YAKLAŞIMLA İNCELENMESİ

YAHYA EMİN DEMİRCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ŞENAY VURAL KORKUT

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HASSAS BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) SERİ82 ÇEŞİDİNDE SARI PAS
(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) ENFEKSİYONU GELİŞİMİNDE ROL ALAN
PROTEİNLERİN PROTEOMİK YAKLAŞIMLA İNCELENMESİ**

Yahya Emin DEMİRCİ tarafından hazırlanan tez çalışması 10.04.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Semra HASANÇEBİ
TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği
ve Biyoteknoloji Enstitüsü

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Semra HASANÇEBİ
TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği
ve Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek KAZAN
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu tez çalışması, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Gen Teknolojileri Laboratuar'ında yürütölmekte olan TÜBİTAK tarafından desteklenen 109T293 numaralı COST projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin sonlarına geldiğim bu noktada, öncelikli olarak eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle önüme ışık tutan, tez çalışmam kapsamında yardım ve yönlendirmeleriyle yanımda olduğunu her daim hissettiğim saygıdeğer hocam, danışmanım, **Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT**'a ve tez çalışmam sürecindeki her bir an, gerek bilimsel bilgi ve deneyimlerini, gerek sonsuz sabır ve kolaylaştırıcılığını, gerekse en içten yardım ve katkılarını hesapsızca önüme sunan, inancını her daim yanı başımda hissettiğim pek değerli hocam, eş danışmanım, **Dr. Semra HASANÇEBİ**'ye sonsuz teşekkürü ödenmesi güç bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü bünyesinde tez çalışmam süresince bilgi ve desteklerini gördüğüm araştırmacılarından **Dr. Ahmet Tarık Baykal** başta olmak üzere, çalışmalarımı kolaylaştıran sevgili **Rahmi Büyükkeskin**'e, tez çalışmam kapsamındaki projede benden evvel çalışmış ve emeklerini her daim hissettiğim sevgili çalışma arkadaşlarım **Cihan İnan** ile **Dilara Maytalmann**'a ve isimlerini burada teker teker sıralayamasam da dostluk ve samimiyetlerini her zaman hatırlayacağım diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerindeki paylaşımlarından ötürü **Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Günel**'e de teşekkürü bir borç bilirim.

Yıldız Teknik Üniversitesi'ndeki yüksek lisans eğitimimin ilk gününden itibaren en büyük motivasyonlarımdan olan, gerek bilgi ve destek gerekse dostluk ve muhabbetlerinden istifade ettiğim Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki sevgili yüksek lisans arkadaşlarım **Bahar IŞIK**, **Dilek ÇAĞLAR**, **Gizem ÇAVUŞOĞLU DOLMA** ve **Neslihan ŞİMŞEK**'e de sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak her daim varlıklarını huzurla yanı başımda hissettiğim, en kıymetli hazinem, en sevdiğime, en değer verdiğime, **AİLEM**'e sonsuz sevgi ve şükranlarımla...

Nisan, 2013

Yahya Emin DEMİRCİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	31
1.3 Hipotez	32
BÖLÜM 2	33
MATERYAL METOD	33
2.1 Bitki Materyalinin Hazırlanması	33
2.1.1 Bitki Materyali	33
2.1.2 Patojen Kaynağı	34
2.1.3 Bitkilerin Enfekte Edilmesi	35
2.1.4 Enfeksiyon Cevabının Mikroskopik ve Makroskopik İncelenmesi	36
2.2 Protein Örneklerinin Hazırlanması	36
2.2.1 Protein İzolasyonu	36
2.2.2 Protein Miktar Tayini ve SDS-PAGE Analizi	38
2.2.2.1 Jelin Hazırlanması	39
2.2.2.2 Elektroforez	40
2.2.2.3 Jelin Boyanması	41
2.3 Proteinlerin Sıvı Kromatografi Sistemi (PF2D) ile İki Boyutlu Ayırımı	41
2.3.1 Cam Malzemelerin Hazırlanması	42

2.3.2	Solüsyonların Hazırlanması.....	42
2.3.3	PF2D Cihazının Hazırlanması	43
2.3.4	Protein Örneklerinin Hazırlanması	45
2.3.5	Örneklerin PF2D Sistemine Yüklenmesi	45
2.3.5.1	I. Boyut Ayırımı.....	45
2.3.5.2	II. Boyut Ayırımı.....	46
2.3.6	Kromatogram Verilerinin Analizi	47
2.4	Proteinlerin Tanımlanması.....	48
2.4.1	Kütle Spektromere (MS) Analizleri İçin Örnek Hazırlığı.....	48
2.4.1.1	Doğrudan Tripsinizasyon.....	49
2.4.1.2	III. Boyut Ayırımı Sonrası Tripsinizasyon	50
2.4.1.3	Triptik Peptidlerin Temizlenmesi	52
2.4.2	NanoLC-ESI-MS/MS ile MS Analizleri.....	52
2.4.3	Verilerin Biyoinformatik Analizi.....	53
BÖLÜM 3		54
SONUÇLAR		54
3.1	İnokulasyon Cevabının Mikroskopik ve Makroskopik Gösterimi.....	56
3.2	Protein İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini	57
3.3	PF2D ile Proteinlerin 2 Boyutlu Ayırımı	58
3.3.1	İki Boyutlu Sanal Jel Haritalarının Oluşturulması.....	63
3.3.2	Enfekte ve Kontrol Protein Profillerinin Karşılaştırılması	69
3.4	Proteinlerin Tanımlanması.....	70
BÖLÜM 4		87
SONUÇ VE ÖNERİLER		87
KAYNAKLAR		117
ÖZGEÇMİŞ		135

SİMGE LİSTESİ

m/z	Kütle/yük
pI	İzoelektrik nokta
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
w/w	Ağırlık/ağırlık
xg	Rölatif santrifügal kuvvet
L	Litre
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
M	Molar
μ M	Mikromolar
kg	Kilogram
g	Gram
%	Yüzde
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

APS	Amonyum persülfat
ATAE	Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Avr	Avirülens
BT	Başlangıç tampon
CF	Kromatofokus - Cromatofocusing
CPA	Faaliyete göre Ürünlerin Sınıflanması Classification of Products by Activity
ET	Elüsyon tampon
ETI	Efektörle Tetiklenmiş Bağışıklık - Effector Triggered Immunity
ETS	Efektörle Tetiklenmiş Hassasiyet - Effector Triggered Susceptibility
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations - BM Gıda ve Tarım Örgütü
GMBE	Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
HISS	Yüksek iyonik tuz solüsyonu - High ionic salt solution
HPCF	Yüksek performanslı kromatofokus fraksiyonlama - High performance cromatofocusing fractionation
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPRP	Yüksek performanslı ters faz - High performance reverse phase
HR	Hipersensitif cevap - Hypersensitive Response
IAA	İndol asetik asit
ITIS	Integrated Taxonomic Information System - Bütünleştirilmiş Taksonomik Bilgi Sistemi
JA	Jasmonik asit
LC	Sıvı kromatografisi
MAS	Belirteç destekli seçim - Marker Assisted Selection
MAMP	Patojenle ilişkili Moleküler Motifler - Microbe Associated Molecular Patterns
MS	Kütle spektrometrisi - Mass spectrometry
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAMP	Patojen ilişkili moleküler motifler
PEG	Polietilen glikol
PF2D	Protein fractionation 2 dimensional
PLGS	ProteoLynx Global Server
PMSF	Fenilmetansülfonil florür
PR	Patojenez ilişkili - Pathogenesis related

PRR	Motif Tanıma Reseptörleri - Pattern Recognition Receptors
<i>Pst</i>	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>
PTI	Patojenle tetiklenmiş immünite
PVPP	Poli(vinil poli-pirolidon)
ROS	Reaktif oksijen türleri
RuBisCo	Rubiloz bifosfat karboksilaz
SA	Salisilik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAGEM	Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü
TARM	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
TEMED	Tetrametiletildiamin
TFA	Trifloroasetik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Birimi - United States of Department Agriculture
UV	Ultraviyole
Vd	Ve diğerleri
Yr	Sarı pas - Yellow rust
2-DE	2 boyutlu jel elektroforezi
2D-LC	2 boyutlu sıvı kromatografisi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 İvriz kaya kabartmaları.....	2
Şekil 1.2 Başlıca buğday türlerinin evrimi	3
Şekil 1.3 Son 10 yılda Dünya ve Türkiye genelindeki toplam buğday üretimi	4
Şekil 1.4 Türkiye'nin 2009 yılında ithalat (A) ve ihracat (B) yaptığı ülkelerin dağılımı	5
Şekil 1.5 Buğdayın dünya çapında en önemli hastalıkları	7
Şekil 1.6 <i>P. striiformis</i> 'e ait püstül yapısı, buğday üzerinde oluşturduğu çizgili görüntü ve etmenin dane verimine etkisi.....	9
Şekil 1.7 <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> yaşam döngüsü.....	10
Şekil 1.8 2000-2009 yılları arasında buğday üreten ülkelerde sarı pas hastalığının mevcut durumu.....	11
Şekil 1.9 Genel olarak bitki-patojen etkileşiminin özeti	14
Şekil 1.10 <i>Pst</i> inokulasyonunun 5. gününde patojenin hifsel gelişimi ve stoma açıklıklarından bitki dokularına girişi	16
Şekil 1.11 <i>Puccinia striiformis</i> 'in enfeksiyon esnasında gerçekleştirdiği yapılar.....	16
Şekil 1.12 Dikaryotik hostoryumun konukçuya ait mezofil hücresi ile etkileşiminin şematik gösterimi.....	18
Şekil 1.13 Bitki-patojen etkileşimi ve bitkide gelişen savunma cevabını açıklayan zigzag modeli.....	28
Şekil 1.14 Genom-transkriptom ve proteom arasındaki bağlantı.....	28
Şekil 1.15 Genel bir proteomik çalışmanın aşamaları	29
Şekil 1.16 Beckman Coulter PF2D Sistemi ve Çalışma Prensipleri	31
Şekil 2.1 Tez çalışmasında kullanılan sarı pasa hassas Seri82 çeşidi	34
Şekil 2.2 Patojen sporlarının inokulasyon için hazırlanması	34
Şekil 2.3 Proteom analizleri için örnek alımı	35
Şekil 2.4 PF2D sistemi ve bileşenlerinin şematik gösterimi	44
Şekil 2.5 Birinci boyut kolonda proteinlerin pI noktalarına göre ayırımı	46
Şekil 2.6 İkinci boyut kolonda proteinlerin hidrofobisitetlerine göre ayırımı	47
Şekil 2.7 M analizi için örnek hazırlığı aşamaları	49
Şekil 3.1 Tez çalışmasındaki iş akışının şematik gösterimi	55
Şekil 3.2 Enfeksiyon cevabının mikroskopik olarak görüntülenmesi	56
Şekil 3.3 Seri82 çeşidine ait kontrol ve enfekte yaprak örneklerinin makroskopik görüntüsü	56
Şekil 3.4 Tüm zaman dilimlerinde üç biyolojik tekrarda, kontrol ve enfekte örneklerin total proteinlerinin SDS-PAGE analiz sonuçları.....	58

Şekil 3.5	Kontrol/enfekte örneklerin 1. boyut ayırımlarında oluşturulan pH gradientleri.....	59
Şekil 3.6	Kontrol/Enfekte örneklerinin 1. Boyut ayırımlarından elde edilen UV1 kromatogramları	60
Şekil 3.7	pH ve UV-1 kromatogramlarının karşılaştırılması sonucu ikinci boyut ayırımı yapılacak fraksiyonların belirlenmesi.....	61
Şekil 3.8	Tüm zaman dilimlerine ait birer örnekte 1. Boyut- pH ve UV-1 kromatogram grafikleri	62
Şekil 3.9	Kontrol ve enfekte örneklerde 2. Boyut ayırma ait UV-2 kromatogramlarının karşılaştırılarak değerlendirilmesi.....	63
Şekil 3.10	a) Birinci ve ikinci boyut verileri kullanılarak oluşturulan iki boyutlu sanal jel haritası b) UV-2 kromatogramlarının 3 biyolojik tekrarda ve kontrol/enfekte örneklerde karşılaştırılarak değerlendirilmesi ve 2. Boyut ayırımın tekrarlanabilirliği	64
Şekil 3.11	Seri82 24. Saat örneklerin biyolojik tekrarları arasında 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması.....	65
Şekil 3.12	Seri82 48. Saat örneklerin biyolojik tekrarları arasında 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması.....	66
Şekil 3.13	Seri82 72. Saat örneklerin biyolojik tekrarları arasında 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması.....	67
Şekil 3.14	Seri82 96. Saat örneklerin biyolojik tekrarları arasında 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması.....	68
Şekil 3.15	DeltaVue yazılımı ile enfekte/kontrol sanal jel haritaları karşılaştırılarak anlatım düzeyi farklı proteinlerin seçilimi.....	69
Şekil 3.16	Enfekte/kontrol sanal jel haritaları karşılaştırılarak anlatım düzeyinde anlamlı farklılık gösteren proteinlerin seçilimi	70
Şekil 3.17	Birden fazla protein piki içerdiği görülen fraksiyonlarda yapılan SDS-PAGE analizi	71
Şekil 3.18	Tanımlanan bitkisel ve fungal proteinlerin her bir zaman dilimindeki dağılımları ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılması	86

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 Türkiye’deki bazı kazılardan çıkarılan bitki kalıntıları ve ait oldukları dönemler	2
Çizelge 1.2 USDA verilerine göre buğday (<i>Triticum aestivum</i>) bitkisinin bilimsel sınıflandırması	3
Çizelge 1.3 Türkiye’nin son beş yıla ait toplam tahıl ve toplam buğday ekim alanları (dekar), üretim (ton) ve verim (kg/dekar) miktarları	4
Çizelge 1.4 <i>Puccinia striiformis</i> ’in taksonomik sınıflandırması	8
Çizelge 2.1 Trypan Blue boyama yönteminde kullanılan solüsyonlar.....	36
Çizelge 2.2 Protein izolasyonu için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları	37
Çizelge 2.3 BSA standartlarının hazırlanması	39
Çizelge 2.4 Protein örneklerinin jele yüklenmesi ve yürütme işlemi için gerekli tamponlar	41
Çizelge 2.5 Jelin boyanması için gerekli solüsyonların içeriği ve hazırlanışı	41
Çizelge 2.6 1. boyut ayırım için solüsyonların içeriği ve hazırlanışı	42
Çizelge 2.7 2. boyut ayırım için solüsyonların içeriği ve hazırlanışı	43
Çizelge 2.8 Doğrudan tripsinizasyon için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları	49
Çizelge 2.9 Jel analizi sonrası tripsinizasyon için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları	51
Çizelge 3.1 Yirmidördüncü saat örneklerde tanımlanan proteinler	72
Çizelge 3.2 Kırksekizinci saat örneklerde tanımlanan proteinler	74
Çizelge 3.3 Yetmişikinci saat örneklerde tanımlanan proteinler	76
Çizelge 3.4 Doksanaltıncı saat örneklerde tanımlanan proteinler	81
Çizelge 4.1 Tanımlanan saldırı ve savunma grubu proteinler ve ekspresyon farklılıkları	92
Çizelge 4.2 Tanımlanan stres grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları	101
Çizelge 4.3 Tanımlanan sinyal iletimi grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları	103
Çizelge 4.4 Tanımlanan transporter grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları	106
Çizelge 4.5 Tanımlanan transkripsiyon grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları	107
Çizelge 4.6 Tanımlanan metabolizma grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları	109
Çizelge 4.7 Tanımlanan enerji metabolizması grubu proteinler ve ekspresyon farklılıkları	111
Çizelge 4.8 Tanımlanan protein metabolizması grubu proteinler ve ekspresyon farklılıkları	114
Çizelge 4.9 Tanımlanan yapı grubu proteinler ve ekspresyon farklılıkları	114

HASSAS BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) SERİ82 ÇEŞİDİNDE SARI PAS (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) ENFEKSİYONU GELİŞİMİNDE ROL ALAN PROTEİNLERİN PROTEOMİK YAKLAŞIMLA İNCELENMESİ

Yahya Emin DEMİRCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Eş Danışman: Dr. Semra HASANÇEBİ

Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*)'nin etmeni olduğu sarı pas hastalığı, dünya çapında en tahripkar hastalıklardan birisidir. *Pst* oldukça kısa zamanda yeni ırklar geliştirme, rüzgar etkisiyle de kolaylıkla ve hızlıca yayılım gösterebilme konusunda yüksek bir potansiyele sahiptir. Dayanıklı buğday çeşidi kullanımı ve fungusit uygulamaları ile sarı pas hastalığı kontrol edilmeye çalışılmaktadır. Bununla birlikte yeni virulent ırklar ve çevresel koşulların etkisiyle dünyanın farklı yerlerinde son derece tahripkar epidemiler meydana gelebilmektedir. Bu yüzden hastalıkla mücadelede daha etkin ve hızlı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda buğday/*Pst* etkileşiminin moleküler mekanizmalarını ve bu süreçlerde işlevsel olan gen ve gen ürünlerinin aydınlatılması önem taşımaktadır. Tez kapsamında proteomik yaklaşım kullanılarak virulent fungal saldırıya karşı bitki incelenmiştir. Çalışma, buğday-*Pst* etkileşiminde hastalık cevabının incelendiği ilk proteomik çalışmalardan biridir. Elde edilen veriler, bu konuda yapılmış genomik ve işlevsel genomik çalışmaları da tamamlayıcı niteliktedir.

Tez çalışması kapsamında sarı pasa hassas buğday çeşidi Seri82 kullanıldı. Patojenle inokule edilmiş (enfekte) ve boş inokulasyon yapılmış (kontrol) bitkilerin 24, 48, 72 ve 96. saat yaprak örneklerinden hazırlanan total protein ekstraktları, PF2D (iki boyutlu protein fraksiyonlama) sisteminde iki boyutlu ayrılarak fraksiyonlandı. Her bir zaman dilimine ait enfekte/kontrol örneklerin protein profilleri bire bir karşılaştırıldı. *Pst* ile

inoküle edilen örneklerde kontrole göre farklı eksprese olan proteinler seçildi ve nanoLC-ESI-MS/MS sistemi kullanılarak tanımlandı.

Tüm zaman dilimlerinde, farklı eksprese olan toplam 193 protein tanımlandı. Tanımlanan proteinlerin %30'u fungal kaynaklı, %70'inin ise konukçu kaynaklı olduğu bulundu. Hem fungal hem de bitkisel proteinler temel biyolojik fonksiyonlarına göre farklı gruplar altında sınıflandırıldı. Bu gruplar patojen saldırısı, bitki savunması, stres cevabı, sinyal iletimi, transport, transkripsiyon, metabolizma, enerji metabolizması (fotosentez ve elektron transportu), protein metabolizması ve yapısalı içermektedir. Ayrıca fungal proteinlerin %70'i bilinen proteinlerden hiç birisi ile homoloji göstermedi ve hipotetik grup olarak sınıflandırıldı. Her bir fonksiyonel grup ve içerdiği protein oranları farklı zaman dilimlerinde çeşitlilik gösterdi.

İnokulasyon sonrası 24. saatte tanımlanan fungal proteinlerden biri konukçu hücre yüzeyine tutunmada rol aldığı bilinen Metil alımı kemotaksis proteini (Methyl-accepting chemotaxis protein-MCP) ile homoloji göstermiştir. Diğer bir fungal protein ise bitki hücrelerine giriş için *Pst* sporlarından gelişen flagella biyosentezinde rol alan FliO/FliZ ile homoloji göstermiştir. İki bitkisel protein ise bitki savunmasının ilk aşamalarında önemli rollere sahip süperoksit dismutazlar (Superoxide dismutases-SOD) ve Flavanon 3 hidroksilaz (Flavanone 3 hydroxylase-F3H) ile homoloji göstermiştir.

48. saat örneklerde ekspresyon artışı gözlenen fungal Endoksilanaz (Endoxylanase Precursor) proteini ise bitki hücrelerine giriş için patojen saldırısının devam ettiğini göstermektedir. Aynı zaman diliminde tanımlanan Metakaspaz 4 (Metacaspase 4-MCA4), pas dayanıklı kinaz Lr10 (Rust resistance kinase Lr10-LRK10), Agmatin kumaril transferaz (Agmatine Coumaroyl Transferase-ACT) ve Lipid transfer proteini (Lipid Transfer Protein-LTP) ise bitki savunmasının önemli proteinlerindendir.

72 ve 96. saatlerde gözlenen fungal İzokorismataz hidrolaz (Isochorismatase hydrolase)'in ekspresyonunun arttığı görüldü. İzokorismataz hidrolaz, salisilik asit üretiminin inhibitörü ve en önemli bitki savunma baskılayıcılardan biridir. Aynı zaman diliminde bitkisel Kitinaz (Chitinase) ve Endokitinaz (Endochitinase) enzimlerinin de anlatımı artmıştır. Bunlar patojen hücre duvarını yıkma ve diğer antifungal özelliklerinden dolayı bitki savunmasında önemli proteinlerdir.

Sonuç olarak; sunulan tez çalışması literatürde karşılaştığımız, buğday-*Pst* etkileşiminde hassasiyet cevabının incelendiği en kapsamlı proteomik çalışmadır ve son derece özgün bulgular içermektedir. Bu sonuçların hastalığın kontrolü için daha hızlı ve etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: 2D-LC, Bitki-patojen etkileşimi, ESI-MS/MS, PAMP, MAMP

ABSTRACT

PROTEOMIC ANALYSIS OF PROTEINS IN SUSCEPTIBLE WHEAT CULTIVAR (*Triticum aestivum* L.) Seri82 UPON DEVELOPMENT OF YELLOW RUST (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) INFECTION

Yahya Emin DEMİRCİ

Molecular Biology and Genetic Department

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Co-Advisor: Dr. Semra HASANÇEBİ

Wheat (*Triticum aestivum* L.) yellow rust, caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*), is one of the most destructive diseases of wheat worldwide. *Pst* has high potential to develop new pathotypes in very short time intervals and spreading easily and rapidly by the effect of wind. There has been attempts to control yellow rust disease by the usage of resistant wheat cultivars and the application of fungicides. However devastating outbreaks of epidemics occur in different parts of world by the effect of environmental conditions and new pathotypes. Therefore development of more effective and rapid disease control strategies are required. It is important to elucidate the molecular mechanisms of wheat-*Pst* interaction and genes and gene products which are functional in this processes. In the thesis, plant defence responses against virulent yellow rust attack were investigated by using proteomic approach. This study is one of the first proteomic studies about disease responses in wheat-*Pst* interaction. Obtained data will be supplementary for the similar genomic and functional genomic studies.

In the scope of this study, yellow rust-susceptible wheat cultivar Seri82 was used. Total protein extracts from pathogen-inoculated (infected) and mock-inoculated (control) plant leaves at 24, 48, 72 and 96th following infection were fractionated with PF2D (Protein Fractionation 2 Dimensional) system. Protein profiles of infected and control samples were compared for each time point. Differentially expressed proteins were selected and identified in *Pst*-inoculated samples as compared with mock-inoculated controls by nanoLC-ESI-MS/MS system.

Totally 193 differentially expressed proteins were identified for all the time point samples. Thirty percent of identified proteins were found to have fungal origin, meanwhile, 70% of proteins were found to have host origin. Both fungal and plant proteins were categorized into different groups based on their basic biological functions. These groups include pathogen attack, plant defence, stress responses, signal transduction, transport, transcription, metabolism, energy metabolism (photosynthesis and electron transport), protein metabolism and structure. In addition, 70% of fungal proteins do not show homology with any known proteins and they were classified as hypothetical group. Relative representation of each group and percentages of proteins showed variations between different time points.

One of the fungal proteins identified at 24th hour post inoculation that showed homology to “Methyl-accepting chemotaxis protein” (MCP) that were found to be functional in adsorption of pathogen to the host cell surfaces. Another fungal protein showed homology to “FlaO/FlaZ” that is found to be expressed for biosynthesis of flagella which germinate from *Pst* spores for penetration to the plant cell. Two wheat proteins showed homology to “Superoxide dismutases” (SODs) and “Flavanone 3 hydroxylase” (F3H) proteins which have significant roles in early stages of plant defence responses.

There was increased expression of “Endoxylanase Precursor” fungal protein at 48th hour and this may indicate that pathogenicity is going on for the penetration to the plant cell. Important plant defensive proteins such as “Metacaspase 4” (MCA4), “Rust resistance kinase Lr10” (LRK10), “Agmatine Coumaroyl Transferase” (ACT) and “Lipid Transfer Protein” (LTP) proteins were also identified at the same time point.

Up-regulation of fungal “Isochorismatase hydrolase” protein were observed at 72 and 96th hours. Isochorismatase hydrolase is inhibitor of salicylic acid production and one of the most important plant defence suppressor. In the same time points, plant “Citinase” and “Endocitinase” enzymes were found to be up-regulated. These are important for plant defence due to their effect on pathogen cell wall degradation and other antifungal features.

As a result; presented thesis is the most extensive proteomic study that can be find in the screened literatures about wheat-*Pst* interaction and results contain unique findings. We expect that our findings will contribute to development of more rapid and effective disease control methods.

Keywords: 2D-LC, Plant-pathogen interaction, ESI-MS/MS, PAMP, MAMP

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Buğday

İnsanoğlu 2.000.000 yıldan bu yana dünya üzerinde yaşamaktadır. Bu sürenin oldukça uzun bir kısmında toplayıcı ve avcı konumunda yaşamışlardır. Son 11.500 yıldan bu yana ise bitkileri ve hayvanları kontrollü koşullarda yetiştirmeye başlamışlardır. Ülkemizin üzerinde bulunduğu topraklar, insanların ilk yerleşim sahaları arasında yer almaktadır [1]. Bu durum ülkemizdeki kazı alanlarından çıkarılan bitki kalıntılarından da anlaşılmaktadır [2] (Çizelge 1.1). Ayrıca bu kalıntılar ülkemiz topraklarının buğdayın anavatanı olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin Konya'da yer alan ve en eski tarım anıtı olarak bilinen İvriz kaya kabartmalarında Kral Warpalavas'ın Fırtına Tanrısı Tarhundas'a sunduğu buğday başaklarının da günümüz buğdayının atası olan Siyez buğdayına ait olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.1).

Buğday, taksonomik olarak Cyperales takımına ait Poaceae familyasından *Triticum* cinsi ile tanımlanmaktadır (Çizelge 1.2) [4]. Kültüre alınmış bütün buğdaylar *Triticum* cinsine aittir [5] ve Bütünleştirilmiş Taksonomik Bilgi Sistemi (Integrated Taxonomic Information System-ITIS) verilerine göre kabul edilmiş 25 tür ile temsil edilmesine rağmen [6] günümüzde genellikle kültürü yapılan buğday çeşitleri tetraploid *Triticum durum* ($2n=4x=28$, A^uA^uBB) ve heksaploid *Triticum aestivum* ($2n=6x=42$, A^uA^uBBDD)'dur (Şekil 1.2) [7].

Çizelge 1.1 Türkiye’deki bazı kazılardan çıkarılan bitki kalıntıları ve ait oldukları dönemler [2]

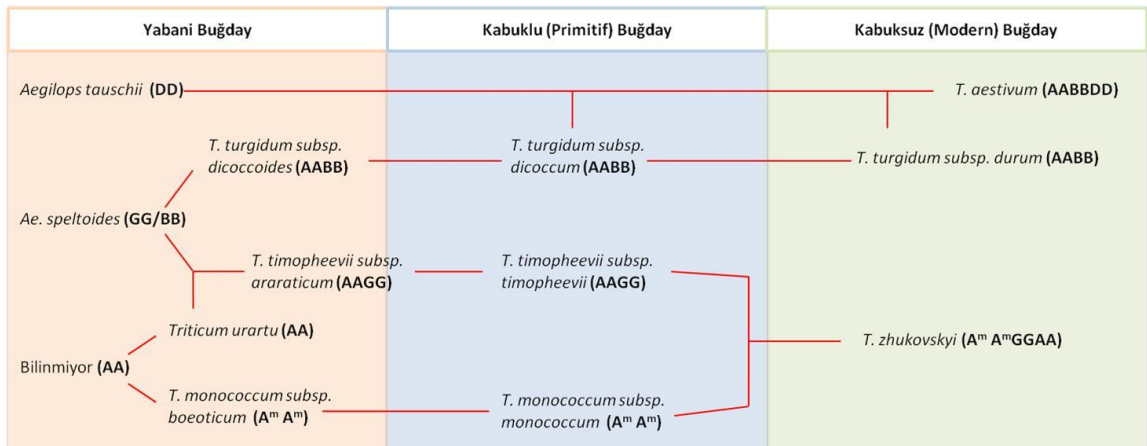
Yaklaşık tarih (MÖ)	Kazı yerleri	Bitki kalıntıları
7500	Aşıklı Höyük	Siyez, gernik, makarnalık buğday, arpa, mercimek, burçak, bezelye, nohut
7200–6500	Çayönü	Yabani siyez, gernik ve arpa; kültüre alınmış siyez, gernik, bezelye, mercimek, fiğ ve keten
6750	Hacılar	Yabani siyez; kültüre alınmış gernik
6500	Can Hasan	Yabani siyez; kültüre alınmış siyez, gernik, buğday, arpa (2 sıralı), mercimek, fiğ
6000–5000	Çatal Höyük	Kültüre alınmış siyez, gernik, buğday, arpa (çıplak), bezelye, fiğ
6000–5000	Erbaba	Kültüre alınmış siyez, gernik, buğday, arpa (2 sıralı ve çıplak), bezelye, mercimek, fiğ



Şekil 1.1 İvriz kaya kabartmaları [3]

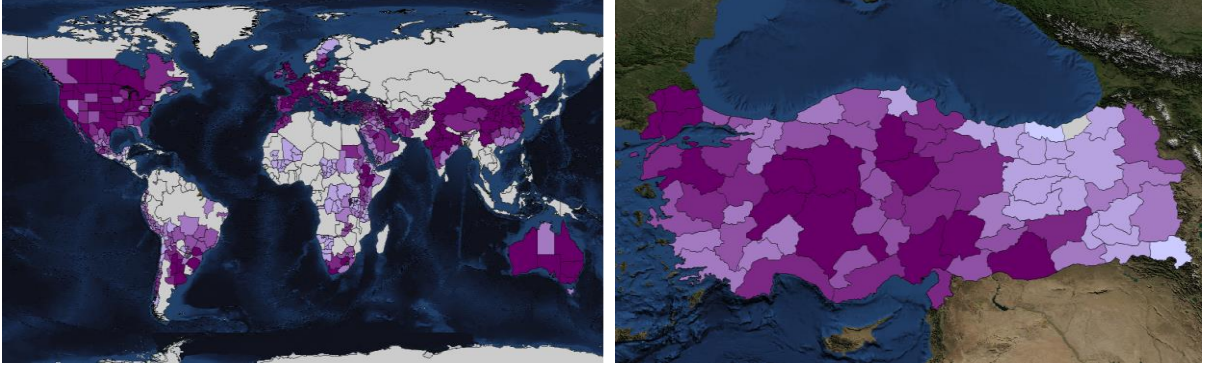
Çizelge 1.2 USDA verilerine göre buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinin bilimsel sınıflandırması [4]

Alem	Plantae	Bitkiler
Alt alem	Tracheobionta	Damarlı Bitkiler
Üst bölüm	Spermatophyta	Tohumlu Bitkiler
Bölüm	Magnoliophyta	Çiçekli Bitkiler
Sınıf	Liliopsida	Tek Çenekli (Monokotiledon)
Alt sınıf	Commelinidae	
Takım	Cyperales	
Familya	Poaceae	Buğdaygiller
Cins	<i>Triticum</i> L.	Buğday
Tür	<i>Triticum aestivum</i> L.	Ekmeklik Buğday



Şekil 1.2 Başlıca buğday türlerinin evrimi [8]

Ülkemizdeki toplam ekim alanlarının yıldan yıla değişmekle birlikte ortalama %70'ini tahıllar oluşturmaktadır [9]. Dünyanın en önemli besin kaynaklarından olan tahıllar içerisinde de buğday, tarımı en fazla yapılan üründür [10]. 2010 FAO verilerine göre dünyadaki toplam tahıl üretiminin % 26,76'sını buğday oluşturmaktadır. Ülkemizde ise yine 2010 verilerine göre toplam tahıl üretiminin % 60,04 ünü buğday oluşturmaktadır [11]. Şekil 1.3'de son 10 yıldaki buğday üretim miktarlarının dünya ve ülkemiz çapındaki miktarları gösterilmiştir.



Şekil 1.3 Son 10 yılda Dünya ve Türkiye genelindeki toplam buğday üretimi (Üretim miktarı ile renk yoğunluğu doğru orantılı verilmiştir) [12]

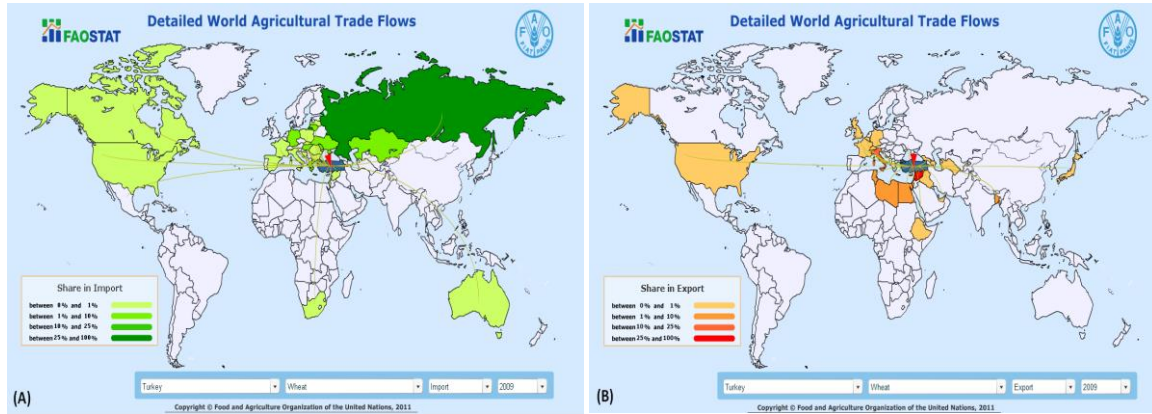
Ülkemiz için son beş yıla ait toplam buğday ve tahıl ekim alanları, üretim miktarları ve verim değerleri Çizelge 1.3’de detaylı bir şekilde verilmiştir. Buna göre Türkiye yıllık yaklaşık 20.000.000 ton buğday üretim miktarı ile dünyanın 9. büyük buğday üreticisi konumundadır [14].

Çizelge 1.3 Türkiye’nin son beş yıla ait toplam tahıl ve toplam buğday ekim alanları (dekar), üretim (ton) ve verim (kg/dekar) miktarları [13]

Yıllar	Ekilen alan (Dekar)		Üretim (Ton)		Verim (Kg/Dekar)
	Buğday (Toplam)	Tahıl (Toplam)	Buğday (Toplam)	Tahıl (Toplam)	
2011	80 960 000	119 034 352	21 800 000	35 202 073	269
2010	81 034 000	121 002 714	19 674 000	32 772 550	243
2009	81 000 000	120 677 087	20 600 000	33 577 151	254
2008	80 900 000	119 899 739	17 782 000	29 287 281	220
2007	80 977 000	124 030 395	17 234 000	29 256 990	213

Ülkemizdeki artan nüfusa paralel olarak buğday talebi de artmaktadır. Nitekim 2010 yılı Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre kişi başına tüketilen tahıl miktarının % 91.40’ı buğdaydan karşılanmıştır. Buğday ülkemiz açısından bu denli önemli bir besin ögesi iken ve buğday üretiminde kendine yeterli sayılabilecek ülkelerden biri olmasına rağmen az miktarda da olsa ithalat yapılmaktadır. Bunun en önemli sebeplerinden biri yıldan yıla değişmekle birlikte, üretilen miktarın yaklaşık % 5’ inin çeşitli nedenlerden dolayı üretim kaybına uğramasıdır. Bir diğer önemli sebep ise ekmeğin yanında, makarna, bulgur, irmik, nişasta ve bisküvi gibi bazı işlenmiş yiyecekler için gereken kalite ve standarttaki buğdayın düzenli ve istenilen miktarda yurt içinden temin edilememesidir. Örneğin TÜİK en son verilerine göre 2010 yılında bu gibi iç piyasa taleplerinin

karşılanabilmesi için yaklaşık dört milyon ton buğday ithal edilmiştir [15], [16]. Bunun yanında Suriye başta olmak üzere İtalya, Mısır, Lübnan, Libya, İsrail gibi birçok ülkeye toplam üretimimizin yaklaşık % 16 kadarı da ihraç edilmektedir (Şekil 1.4) [15],[17]. Bu açıdan bakıldığında buğday ülke ekonomisinde katma değeri yüksek bir üründür.



Şekil 1.4 Türkiye'nin 2009 yılında ithalat (A) ve ihracat (B) yaptığı ülkelerin dağılımı [17]

Buğdayda verim ve kalite kayıplarına yol açan en önemli etmenlerden birisi de stres faktörleridir. Stres faktörleri abiyotik stres faktörleri (kuraklık, tuzluluk, yüksek veya düşük sıcaklık, ışık miktarının azlığı veya fazlalığı, gelişim için gerekli olan maddelerin yetersizliği, pestisitler ve ağır metaller) ve biyotik stres faktörleri (virus, bakteri, mantar gibi patojenler, böcek gibi zararlılar ve diğer organizmalar) olarak sınıflandırılmaktadır [18]. Biyotik ve abiyotik stresler, ekonomik önemi olan tahıllar dahil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmakta, bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltmakta, normal fonksiyonlarını değiştirmekte ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilmektedir [19]. Sadece biyotik stres faktörlerinden virus, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklar sebebiyle, tarım ürünlerinde yaklaşık %12'lere varan kayıplar meydana gelebilmektedir.

1.1.2 Buğday Hastalıkları

Tahıllarda hastalık oluşturan ve dünyada en yaygın görülen patojenik etmenler; *Puccinia* (pas), *Ustilago* (rastık), *Tilletia* (sürme), *Erysiphe* (külleme), *Septoria* (septorya), *Alternaria* (alternarya), *Fusarium* (fusaryum), *Helminthosporium* (helminthosporium), *Xanthomonas* ve *Pseudomonas* (bakteriyel yanıklıklar) ve Barley

Yellow Dwarf Virus (Arpa sarı cücelik virüsü)'dür. Buğdaya bakıldığında ise dünya çapındaki en önemli hastalıkları Şekil 1.5'da gösterilmiştir.

Türkiye'de ise bu hastalıkların hemen hepsi görülmekle birlikte buğdayda verim ve kaliteyi düşüren en önemli hastalıkların başında pas hastalıkları gelmektedir [21]. Örneğin ülkemizde 2009/2010 yılında kaydedilen iklimsel koşullar, aşırı yağış ve yüksek nemden kaynaklanan özellikle pas, septorya, kök ve kök boğazı çürüklüğü gibi hastalıkların da etkisiyle, Türkiye genelinde buğday verimi ve üretimi % 20 düzeyinde kayba uğramıştır. Özellikle pas hastalıkları açısından üreticinin zamanında uyarılmaması ve gerekli mücadelenin yapılmaması nedeniyle ortaya çıkan ekonomik zararın 200 milyon TL düzeyinde olduğu hesap edilmektedir [22].

Buğdayda etkili olan 3 önemli pas türü vardır. Bunlar sarı pas (veya çizgi pası; etmen: *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* West), kahverengi pas (veya yaprak pası; etmen: *Puccinia recondita tritici* Rob. et Desm.) ve kara pas (veya gövde pası; etmen: *Puccinia graminis tritici* Eriks. et Henn.) hastalığıdır [23]. Ülkemizde sarı pas hastalığı daha çok İç ve Doğu Anadolu bölgelerinde görülürken; kahverengi pas sahil bölgelerinde; kara pas ise Güney, Batı ve İç Anadolu'da yaygındır. Sarı pas hastalığı sadece ülkemizde değil, benzer iklim özelliklerine sahip buğday üretimi yapan birçok ülkede yaygın olarak görülmekte ve yüksek oranlarda verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır [24], [25].



Puccinia graminis f.sp. *tritici*
(Gövde Pası)



Puccinia recondita f.sp. *tritici*
(Yaprak Pası)



Puccinia striiformis
(Sarı Pas)



Cochliobolus sativus
(Siyah Nokta)



Fusarium spp.
(Fusarium kök ve başak çürüklükleri)



Corticium rolfsii
(Kar Küfü)



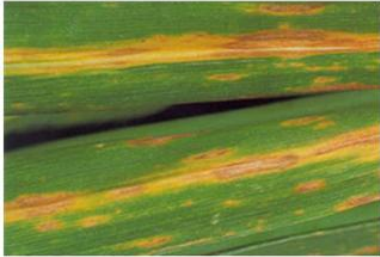
Pyrenophora tritici-repentis
(Sarı Yaprak Lekesi)



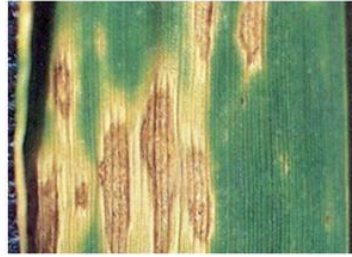
Erysiphe graminis
(Mildiyö)



Mycosphaerella graminicola –
Septoria tritici (Yaprak Lekesi)



Phaeosphaeria nodorum
(Mürekkep Lekesi)



Alternaria spp.
(Alternaria yaprak yanıklığı)



Ustilago nuda f.sp. *tritici*
(Rastık)



Rhizoctonia spp.
(Rhizoctonia kök çürüklüğü)



barley yellow dwarf luteovirus
(Arpa Sarı Cücelik Virüsü)



Xanthomonas translucens pv. *undulosa*
(Bakteriyel yaprak çizgi hastalığı)

Şekil 1.5 Buğdayın dünya çapında en önemli hastalıkları [20]

1.1.3 Sarı Pas Hastalığı

1.1.3.1 Hastalık Etmeni *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

Puccinia striiformis f. sp. *tritici* (*Pst*)'nin sebep olduğu sarı pas hastalığı tüm dünyada en önemli ve en tahripkar buğday hastalıklarından biridir [26]. Sarı pas, muhtemelen çok önceleri mevcut iken, ilk kez 1777'de Avrupa'da Gadd tarafından tanımlanmıştır [27]. Bunun ardından 1725'de İngiltere'de ve 1794'de İsveç'te kaydedilen epidemilerin de sarı pas olduğu düşünülmektedir [28] ve bugüne kadar ki süreçte dünya çapında 60'dan fazla ülkede etkilidir [26].

Pst tahıl ürünlerinde ve çimlerde sarı pas enfeksiyonunu gerçekleştiren Basidiomycota şubesinden Uredinales takımına ait, sadece canlı konukçu dokuda parazit olarak yaşamını sürdürebilen obligat biyotrofik bir patojendir (Çizelge 1.4) [29], [30]. Patojen, 1953 yılında şuan ki tür ismi ortaya çıkarılmadan önce *Uredo glumarum* (1827), *Puccinia striaeformis* (1854), *Puccinia straminis* (1860), *Puccinia glumarum* (1894) gibi birkaç isim değişikliği geçirmiştir [27].

Çizelge 1.4 *Puccinia striiformis*'in taksonomik sınıflandırması

Alem	: Fungi
Şube	: Basidiomycota
Sınıf	: Urediniomycetes
Alt Sınıf	: Incertae sedis
Takım	: Uredinales
Familya	: Pucciniastraceae
Cins	: <i>Puccinia</i>
Tür	: <i>P. striiformis</i> var. <i>striiformis</i>

Pst 'in konukçuları arasında buğday, arpa, tritikale, çavdar gibi tahıllar ve çimenler yer almaktadır [31]. Etmenin buğday, arpa ve çavdar gibi küçük taneli tahıl konukçularına göre özelleşmiş formları ve virülensliği farklı ırkları vardır [27], [29]. Patojenin 2010 yılına kadar alternatif konukçusu bilinmezken, Jin [32] hassas *Berberis* spp. türlerinin patojenin alternatif konukçusu olduğunu ortaya çıkarmış ve patojenin yeni ırklarının

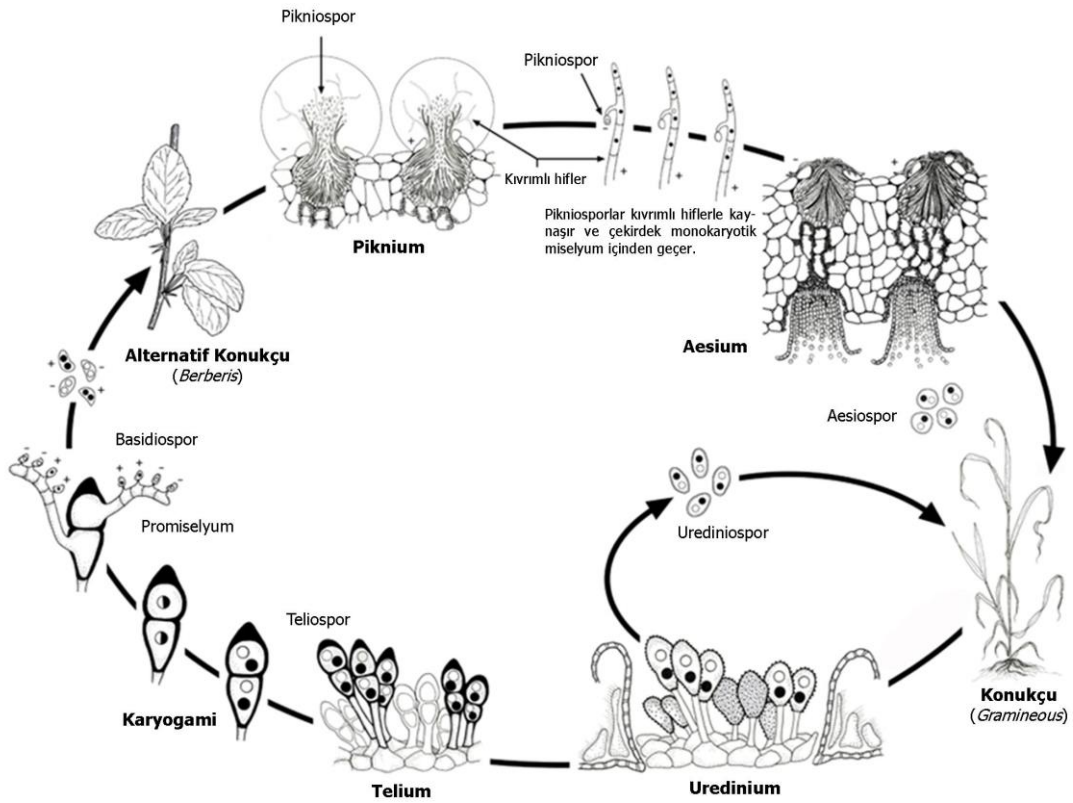
gelişmesinde büyük rol oynadığını göstermiştir. Dolayısı ile patojen, *Berberis* türleri üzerinde eşeyli üreme, mutasyonlar veya somatik hibridizasyonlar geçirerek dayanıklı olarak bilinen buğday genotiplerini hastalandırabilen yeni ırklar oluşturmaktadır.

Buğdayda sarı pas etmeni olan *Pst*, bitkilerin yeşil aksamını enfekte etmektedir. Enfeksiyon bitkilerin tek yapraklı döneminden yeşil aksamını koruduğu olgunluk dönemine kadar ki süreç içerisinde her zaman gerçekleşebilmektedir. Ülkemizde bu dönem genellikle mevsimsel ve yöresel iklim koşullarına göre değişmekle birlikte ilkbaharda patojen için optimum hava sıcaklığı olan 10-15 derece ve nemin yüksek olduğu zamana denk gelmektedir. Bitkideki ilk semptomlar enfeksiyonun haftasında yapraklarda sarı çizgiler halinde (pre-pustules) görülmeye başlar ve bunu yaprakların üst yüzeylerinde, ilerleyen dönemlerde yaprak kınında ve hastalığın şiddetli geçtiği yıllarda kavuz veya kılçıklar üzerinde [33] makine dikişine benzer püstüllerin oluşumu izler (Şekil 1.6). Bu püstüller limon veya portakal rengindedir. Bitki olgunlaştıkça enfekteli dokular kahverengimsi ve kuru bir görünüm kazanabilir. Bu püstüllerin içinde enfeksiyonun 2. haftası itibarı ile 20-30 µm çapındaki, tek hücreli, dikaryotik (n+n) yazlık sporlar (ürediospor) oluşur. İlkbaharda püstüllerden püskürtülen milyonlarca yazlık spor genellikle rüzgarla ve diğer taşıyıcılarla ülkeler hatta kıtalar arası uzağa taşınır. Uygun koşullarda taşındığı buğday bitkilerini enfekte eder ve yeni ürediosporlar üretir [35].



Şekil 1.6 *P. striiformis*'e ait püstül yapısı, buğday üzerinde oluşturduğu çizgili görüntü ve etmenin dane verimine etkisi [34]

Pst obligat biyotrofik bir patojendir. Bu nedenle hayat döngüsünü (Şekil 1.7) konukçu bitkiler üzerinde tamamlar. Etmenin ürettiği yeni ürediosporların çimlenip konukçuya giriş yapabilmesi için %100'e yakın nisbi neme ve yağışa ihtiyaç duyulur. Ürediospor oluşumunu telialar içerisinde oluşan ve etmenin kışlık sporu olan iki hücreli, diploid (2n) teliospor oluşumu izler. İlkbaharda bu teliosporlar çimlenerek tek hücreli, haploid (n) basidiosporları oluştururlar [35]. *Berberis* türlerinin, etmenin alternatif konukçusu olduğu ortaya çıkarıldıktan sonra [27], basidiosporların *Berberis* bitkisi yapraklarında çimlenerek enfeksiyon yaptığı ve bir süre sonra yaprağın üst yüzeyinde piknia, alt yüzünde aesia adlı yapıları oluşturdukları düşünülmektedir. Aesialardan meydana gelen aesiasporlar rüzgarla taşınarak yeni konukçuları üzerinde uygun koşullarda çimlenip ürediniaları ve bunlarda yazlık ürediosporları meydana getirirler. Bu sporlarda rüzgarla taşınarak diğer bitkileri enfekte etmek üzere yayılır.

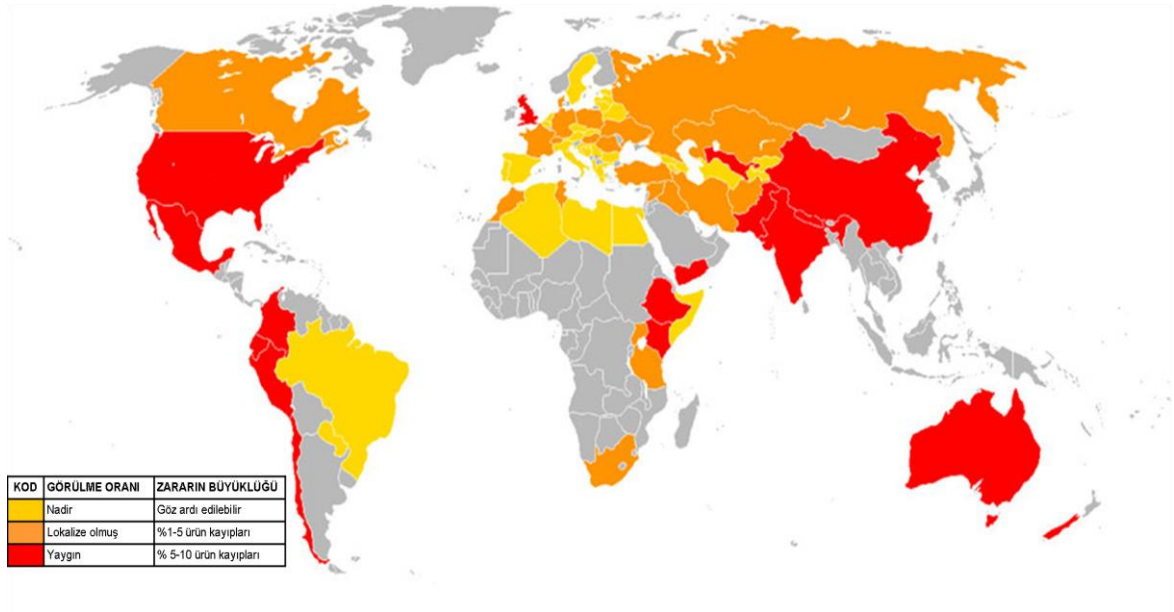


Şekil 1.7 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* yaşam döngüsü

1.1.3.2 Hastalığın Yayılışı ve Verim Kayıpları

Etmen konukçu bitkide büyüyüp çoğalırken konukçu bitkinin su ve besin elementlerinden faydalanır. Enfekte ettiği yapraklarda, özellikle başaktaki tanelerin gelişimini sağlayan bayrak yaprakta fotosentezi baskılayarak kuru ve kalitesiz tane oluşumuna neden olur. Bu şekilde bitkinin gelişimini kısıtlar, verim ve kalite kayıplarına neden olur (Şekil 1.6) [36], [34], [27], [35].

Elverişli iklim koşulları ve özellikle hassas çeşit kullanımında verim ve kalite kayıpları %30-100 oranları arasında olabilmektedir [37], [38]. Dünya çapındaki buğday üretim alanlarında farklı dönemlerde farklı şiddette epidemiler görülmeye devam etmektedir. 2000-2009 yılları arasında buğday üreten ülkelerdeki hastalığın görülme oranı ve zararın büyüklüğü Şekil 1.8’de özetlenmiştir.



Şekil 1.8 2000-2009 yılları arasında buğday üreten ülkelerde sarı pas hastalığının mevcut durumu [28]

(Lokalize olmuş; 5 yılın 2 yılında %25’in üzerindeki tarım alanlarında. Yaygın; 5 yılın 2-3 yılında tüm üretim bölgesinde)

Haritada görüldüğü üzere, Morgounov vd. [39], 5 orta Asya ve 3 Kafkasya ülkesinde yaptıkları çalışmada sarı pasın bölgede buğday üretimini kısıtlayan başlıca biyotik faktör olduğunu ve son 5 yıldır bölgeyi etkisi altına aldığını bildirmişlerdir. Yine 1996’dan beri hemen her sene güneybatı Çin’de yaygın sarı pas epidemileri görülmektedir [40]. Amerika Birleşik Devletleri’nde de hastalığın zarar boyutunun arttığı yakın zamanda

bildirilmiştir [34]. Bu haritaya göre Türkiye orta şiddette risk taşımaktadır. Ancak bu durum, patojenin sık mutasyon geçirmesi, kısa sürede virulent özellikte yeni patotipler oluşturması, ve bu yeni patotiplerin rüzgarla ülkeler ve kıtalar arası taşınması nedeniyle son derece değişkendir. Örneğin, sarı pas *Yr9* dayanıklılık geni üzerinde etkili olan bir sarı pas patotipi, 1986 yılında Doğu Afrika’da ortaya çıkıp hava akımlarıyla taşınarak Kuzey Afrika, Batı Asya ve Güney Asya’ya yayılmıştır [23]. Bunun sonucunda Etiyopya, Türkiye, İran, Afganistan ve Pakistan’da büyük kayıpların ortaya çıkmasına neden olmuştur. 1990’ larda ülkemizin güney bölgelerinde yoğun olarak ekilen ve *Yr9* dayanıklılık genini içeren Seri82 çeşidi bu epidemiden çok etkilenmiştir, %50-60’lık verim kaybı nedeniyle de (bugünkü değeri yaklaşık 7 trilyon) üretimden kaldırılmıştır [41]. Yine 1998 yılında uzun süren serin ve yağışlı hava koşullarının etkisi ile Orta Anadolu’da kontrol edilen alanların %98’inin enfeksiyona maruz kaldığı görülmüştür [42]. Şiddetli epidemiler ülkemizde son yıllarda da görülmeye devam etmektedir. Özellikle 2009-2010 yıllarında Suriye’de ortaya çıkan yeni bir patotip nedeniyle Orta Anadolu ve geçit bölgelerinde enfeksiyon şiddetleri artarak ülkemizin Ankara, Konya, Eskişehir, Çukurova, Samsun, Amasya, Uşak gibi önemli buğday üretim alanlarında yüksek verim ve kalite kayıplarına yol açmıştır [43].

1.1.3.3 Etmene Karşı Mücadele

Sarı pas hastalığı %30-100 oranları arasında verim kayıplarına yol açtığı için buğday üretiminde global bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle, patojene karşı koruma önlemlerinin alınması gıda güvenliği bakımından da önem taşımaktadır [38].

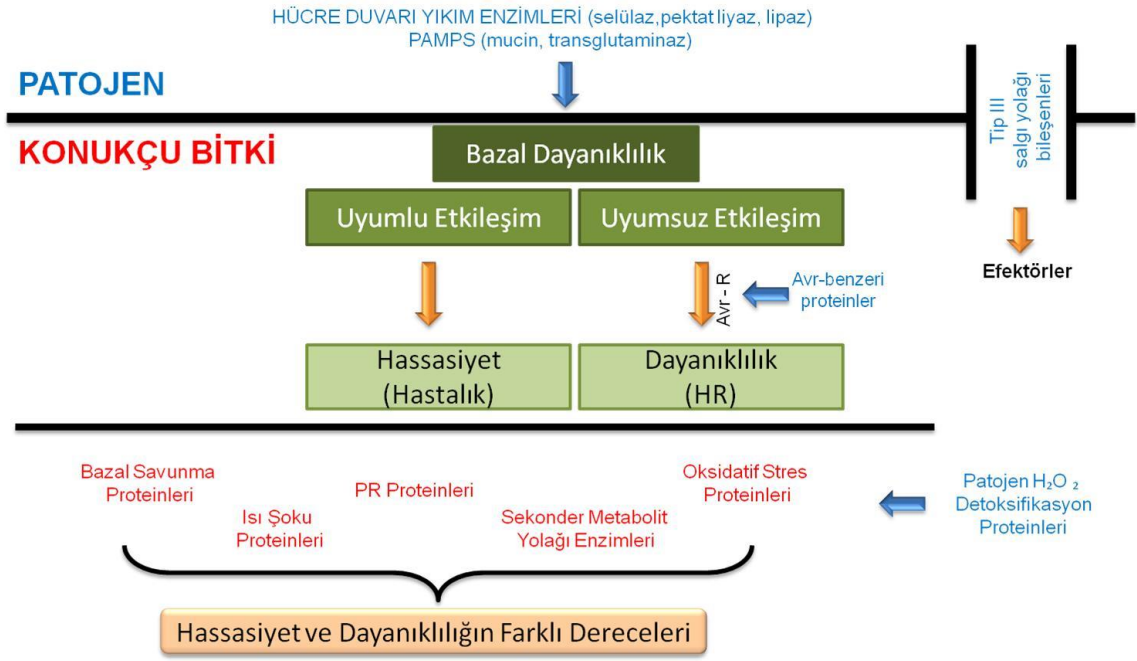
Hastalığın kontrolünde, erken dönemden itibaren ekili alaların periyodik olarak izlenmesi büyük önem taşımaktadır [34]. Bu sayede diğer pas türlerine göre daha erken dönemde görülen sarı pas hastalığını önlemek hem daha kolay hem de daha ekonomik bir mücadele yöntemi olmaktadır. Bunun yanı sıra sık ekim yapılmaması, yabancı otlarla mücadelenin zamanında yapılması ve gereğinden fazla gübrelemeden kaçınılması koruma amaçlı yapılan diğer uygulamalardır. Tarla içerisinde veya çevresinde paslarda yeni ırkların oluşumunda önemli bir etken olan ara konukçular (*Berberis* spp., vs.) imha edilmesi, özellikle de dayanıklı buğday çeşitlerinin yaygın olarak kullanılması da son derece önemli uygulamalardır [33].

Kimyasal mücadelede, hastalığın görüldüğü yerlerde ve hassas buğday çeşitlerinin ekildiği alanlarda yeşil aksam ilaçlaması uygulanmaktadır. İlk ilaçlama, ilk pas püstüllerinin görünmeye başladı zaman yapılmaktadır. Genellikle iki ilaçlama pas hastalıkları için yeterli olmakla birlikte epidemi yapma ihtimaline karşı üçüncü ilaçlama da yapılabilmektedir [33]. Fungusit uygulamalarının buğday üretimindeki girdi maliyetini arttırmasının yanı sıra insan ve çevre sağlığı açısından oluşturduğu riskler ve fungusite dirençli patojen ırklarının ortaya çıkışı gibi önemli olumsuz etkileri vardır. Bu nedenle dayanıklı çeşit kullanımı hem daha ekonomik hem de insan sağlığını tehdit etmeyen, çevreci bir mücadele yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır [34]. Fakat buğday gibi büyük ve karmaşık genoma sahip bitkilerde klasik yöntemlerle dayanıklı çeşit geliştirmek 13-14 yıl süren ve yoğun emek gerektiren bir süreçtir. Oysa patojen kısa sürede (1-3 yıl) yeni virülens özelliğe sahip ırklar geliştirebilme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle mücadele için yeni stratejilerin geliştirilmesinde bitkide direnç ve hassasiyet cevabını yöneten moleküler mekanizmanın aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

1.1.4 Bitki-Patojen Etkileşimi

Bitkilerdeki doğal savunma mekanizmaları genellikle patojenlerin çoğuna karşı dirençli olmasını gerektirir. Dolayısıyla bir patojenin konukçuda hastalık oluşturmada aslında sıra dışı bir durumdur. Çünkü bitkiler kalıtsal olarak saldırgan patojeni tanıma potansiyeline ve başarılı bir savunma geliştirme yeteneğine sahiptirler. Fakat tam tersi de başarılı patojenler için geçerlidir ve patojenler konukçunun tanıma mekanizmasından kurtulmak ya da konukçunun savunma mekanizmasını baskılamak gibi özelliklere sahiptirler [44].

Patojenin bitkiye saldırmasıyla bitkide harekete geçen bazal metabolizma uyumlu etkileşim (hassasiyet) veya uyumsuz etkileşim (dayanıklılık) yanıtı ile sonuçlanır. Her iki etkileşimde de savunmayla ilişkili ve biyotik stresden sorumlu birçok protein indüklenir. Bitki-patojen etkileşiminin genel özeti Şekil 1.9'da sunulmuştur.



Şekil 1.9 Genel olarak bitki-patojen etkileşiminin özeti [45]

1.1.4.1 Patojendeki Reaksiyonlar

Bitki-patojen etkileşimleri patojenin saldırısı, yayılma yolları ve bitkinin savunma mekanizması arasındaki çok ince bir denge ile yönetilmektedir [46]. Bu etkileşim üzerinde yapılan çalışmalarda kimi araştırmacılar bitki cephesine yoğunlaşırken kimileri de patojene odaklanmıştır [47]. Her patojen konukçusunu ele geçirmek için kendine özgü bir yol geliştirmiştir. Bazı türler mekanik basınç uygulayarak ya da enzimatik saldırıyla direkt yüzeyden giriş yaparken, bazıları doğal açıklıklardan (stoma, lentisel, vs.), bazıları da yalnızca dokuda açılmış yaralardan giriş yapmaktadır. Konukçuya giriş yapan patojen, konukçudan faydalanırken bitki ile girdiği etkileşime göre nekrotrofik, biyotrofik ve hemibiyotrofik olmak üzere üç grupta incelenir [48].

Nekrotrofik patojenler konukçuya özelleşmemiş, fırsatçı patojenlerdir. Dokuya yara veya doğal açıklıklardan (özelleşmemiş) giriş yaparlar. Nekrotrofikler toksin ve litik enzimler salgılayarak hücre ölümüne ve doku maserasyonuna sebep olur. Sonrasında ise patojen besin kaynağı olarak hücrelerin yıkılmasıyla oluşan ürünleri kullanır [48].

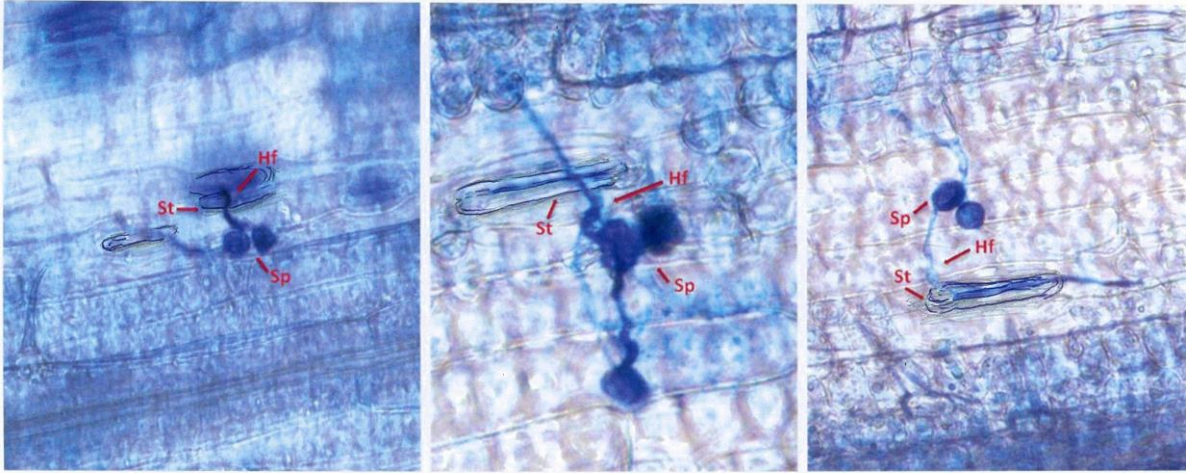
Biyotrofik patojenler ise konukçularına özelleşmişlerdir. Dokuya direkt mekanik yolla ya da doğal açıklıklardan (Pas etmenlerinde olduğu gibi) özelleşmiş yapılar aracılığıyla giriş yaparlar (Örn., hostorya oluşumu). Bazıları çok az sayıda litik enzim ve toksin salgırlar.

Konukçu hücreden istifade ettiği sürece yaşamasına izin verir [49]. Konukçu aralığı nekrotrofiklere nisbeten daha dardır ve sağlıklı bitkilere tüm dönemlerinde saldırabilmektedir.

Hemibiyotrofik patojenlerde ise bitki hücreleri enfeksiyonun ilk aşamalarında canlı kalırken, enfeksiyonun son dönemlerinde konukçuyu öldürür [50]. Hemibiyotrofikler ilk gelişimlerini biyotrofikler gibi sürdürüp sonraki aşamalarında nekrotrofik gibi hareket ederler. Hücreler arası hifler konukçu doku içerisinde dallanarak gelişim gösterir ve sonuçta hücrelerin ölümüne sebep olur [51]. Fakat patojen ölü doku üzerinde de hayatını sürdürebilmektedir [52].

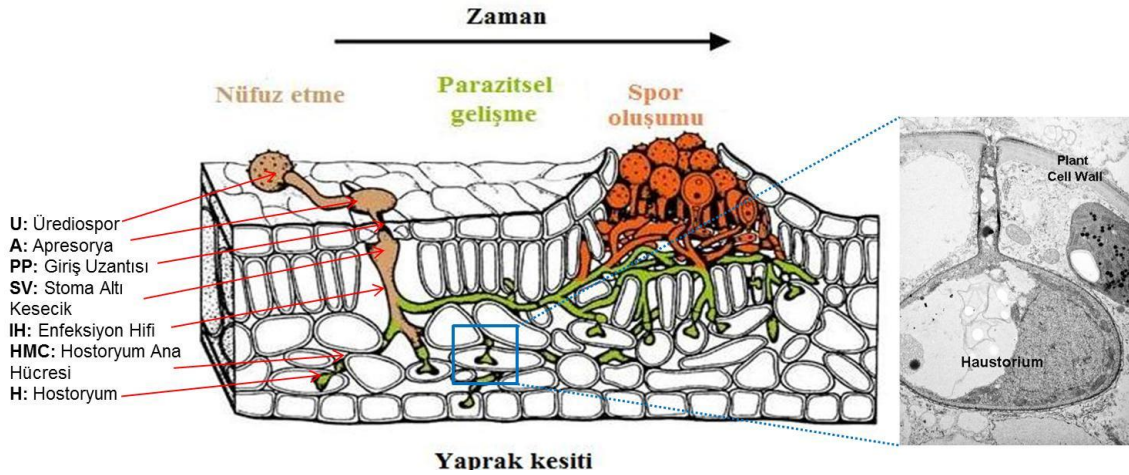
Teze konu olan sarı pas hastalık etmeni *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) biyotrofik bir fungustur. Bu nedenle patojen saldırısı ve hastalık gelişimine dair gerçekleşen olaylar öncelikle *Pst* olmak üzere genel biyotrofik fungal patojenler temel alınarak açıklanmıştır.

Biyotrofik etkileşimde patojen uzunca bir süre konukçusundan canlı olarak istifade edeceği için konukçuya giriş yaparken azami derecede zarar vermeye özen gösterir. Bu bağlamda konukçuya giriş yaparken mekanik basınçla ya da enzimatik yolla giriş yapmak yerine stomalar aracılığıyla doğal açıklıklardan giriş yaparlar. Konukçuya ilk tutunma yüzeydeki hidrofobik etkileşimler sayesinde olur. Konukçu ile ilk temas, sporun çimlenme gözeneklerinin lizizinden meydana gelen düşük moleküler ağırlıklı karbohidrat ve glukozile polipeptitlerden oluşmuş bir ekstraselüler matriksin üretimini harekete geçirir. Bu matriks, fungal kitinaz ve esteraz enzimlerinin de etkisi ile bir tutunma yüzeyinin oluşumuna katkı sağlar. Etmenin hastalık yapan ürediosporları (Urediniospore-U) tek hücrelidir ve dış çeperleri dikenli, hidrofobik bir yüzeyle kaplıdır. Bitki dış yüzeyindeki stomalara yerleşen ürediosporlar doku içerisine doğru bir çimlenme borusu (Germ Tube-GT) oluşturur. Oldukça hassas bir yüzey tanıma sistemi olan çimlenme borusu, yaprak üst zarının topoğrafik özelliklerine göre ilerleyerek stoma açıklıklarına ulaşmaya çalışır (Şekil 1.10) [53].



Şekil 1.10 *Pst* inokulasyonunun 5. gününde patojenin hifsel gelişimi ve stoma açıklıklarından bitki dokularına girişi (Hf: Hif, St: Stoma, Sp: Spor) [Tez çalışmasından]

Çimlenme borusu farklılaşarak apresoryum (Appressorium-A) yapısını oluşturur. Apresoryum bitki ile patojenin sıkı biçimde bağlanmasını sağlayarak patojenin konak hücre ve dokuları içine doğru büyümesine öncülük eder. Fungal sitoplazma çimlenme borusu içerisine doğru taşınarak yapışkan ekstraselüler matriksle bitişik bir şekilde yüzeyde kıvrılarak ilerler ve apresoryuma aktarılır. Apresoryum da stoma boşluklarından yaprağın içerisine penetrasyonu sağlayan giriş uzantıları (Penetration Peg-PP) meydana getirir (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 *Puccinia striiformis*'in enfeksiyon esnasında gerçekleştirdiği yapılar [54]

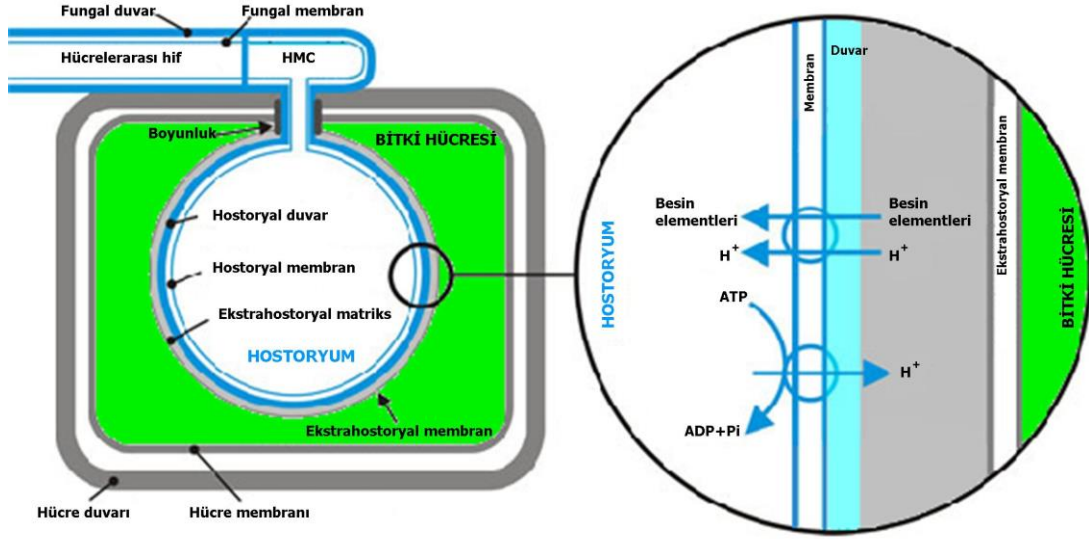
Apresoryumun giriş uzantılarına farklılaşması esnasında selüloz, proteinaz ve kitin deasetilaz gibi bazı fungal litik enzimlerde etkindir. Apresoryumdan farklılaşan giriş uzantıları stoma oyukları boyunca uzayarak stoma altı kesecikleri oluşturur

(Substomatal Vesicle-SV) ve sonrasında bu giriş uzantılarından bir bölme ile ayrılır. Bu kesecikler daralarak enfeksiyon hiflerini (Infection Hypha-IH) oluşturur ve bu esnada konukçu hücre duvarının parçalanmasında etkin olan pektin esterase, metilesteraz ve selüloz gibi fungal enzimler de ortaya çıkar. Stoma altı kesecik ve enfeksiyon hifi genellikle inokulasyonu takiben 15. saat içerisinde gözlenmektedir [55]. Enfeksiyon hifi mezofil hücreleriyle temas ettiğinde bir hostoryal ana hücresine (Haustorial Mother Cell-HMC) farklılaşır ve enfeksiyon hifinden bir bölme ile ayrılır. Sitoplazma hostoryum ana hücresi içerisine taşınır. Sonrasında hostoryum ana hücresi de konukçu hücreye giriş yapmasını sağlayacak olan ve plasma membranının içerisini kaplamasına yardımcı olan hostoryum (Haustorium-H) yapısını oluşturur [54], [48].

Hostorya, konukçu ile biyotrofik ilişkiyi kuran ve devam ettiren esas yapıdır ve besin alınımında önemli rol oynar [56]. Metabolik aktivite hostorya içerisinde dışarıdaki gelişimlere nazaran daha fazladır. Hostorya fungusun konukçu ile temas ettiği geniş yüzeyden organik karbon alımını sağlar. Absorbe edilen karbon hemen genellikle doğal bir disakkarit olan trehaloz ($C_{12}H_{22}O_{11}$) olarak fungusun kalan diğer vücut hücrelerine (thallus) taşınır. Şekerin hücreler arası boşluğa iletimi difüzyon eğimine göre düzenlenir. Hostoryum bazı durumlarda amino asit ve sülfür/fosfat alınımında da gereklidir [57].

Uromyces fabae pas etmeni ve konukçusu *Vicia faba* ile yapılan bir çalışmada patojen ve konukçusu arasındaki duvar ve membran yapıları ile detaylı hostoryum yapısı Şekil 1.12’de şematize edilmiştir. Şeklin büyültülmüş halinde ise hostorya içerisinde fungal ATPaz’lar etkinliğinde proton pompalanması ve bitki hücresinden besin elementlerinin alınımı gösterilmiştir [48].

Hostoryum yapısının geliştikten sonra farklı yapılara farklılaştığına dair çalışmalar mevcuttur. Lee ve Lee [58], *Cuscuta australis* bitkisiyle yaptıkları çalışmada hostoryum hifinin son olarak bitki gövdesindeki ksilem ve floem hiflerine farklılaştığını rapor etmişlerdir.



Şekil 1.12 Dikaryotik hostoryumun konukçuya ait mezofil hücresi ile etkileşiminin şematik gösterimi (fungusa ait yapılar mavi, bitkiye ait yapılar ise yeşil renkleriyle belirtilmiştir) [48]

Konukçu hücre içerisinde hostoryum yapısını geliştiren patojen hayat döngüsünü tamamlayabilmek için gerekli besin elementi ve enerji ihtiyacını konukçudan karşılarken, konukçada enfeksiyon süreci başlamış olur. Patojen enfeksiyon sonrasında oluşturduğu ürediosporların yeni bitkilere taşınmasıyla yaşam döngüsünü devam ettirir.

1.1.4.2 Bitkideki Reaksiyonlar

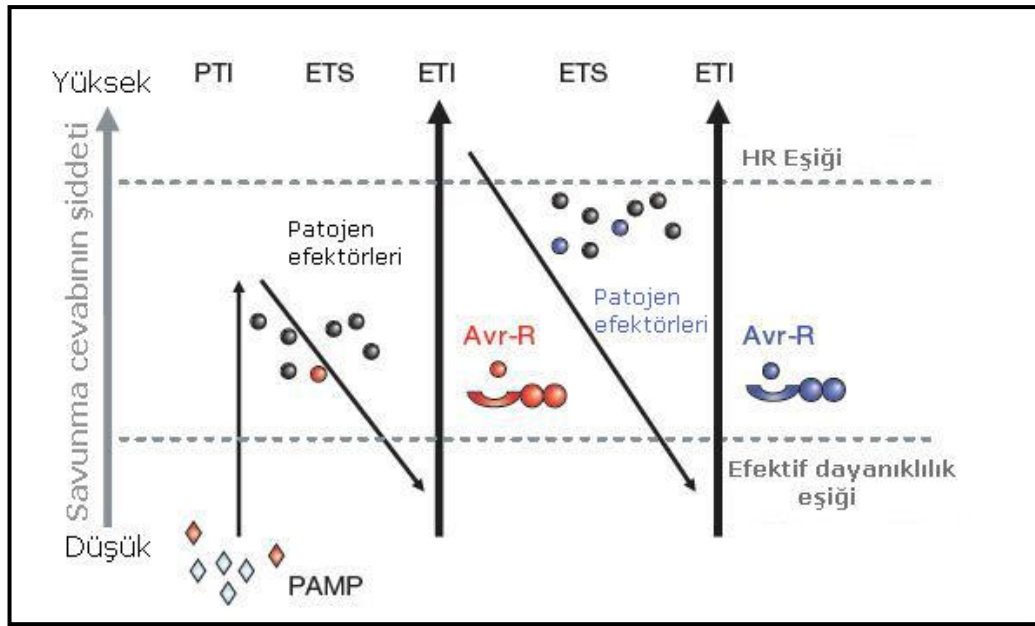
Bitki patojenle karşılaştığında patojenin dokulara girişini ve gelişmesini engelleyecek savunma mekanizmaları ve yapıları geliştirir. Kütikula ile kaplanmış hücre duvarları bitkinin ilk savunma hattını oluşturur ve patojenin bitkiye girişini sınırlar. Sarı pas gibi biyotrofik patojenlerde, patojenin yaşamını sürdürüp çoğalabilmesi için mutlaka bitki hücreleri içine giriş yapması ve hücre içeriğini kullanması gerekmektedir. Bu nedenle patojenin ilk hedefi yaprak yüzeyine tutunarak doğrudan stomalar veya yaralar gibi doğal boşluklardan ya da hidrolitik enzimler ve/veya enfektif yapılar olan apresoryumlar aracılığıyla dolaylı olarak bitki hücresine giriş yapmaktır [59]. Patojen saldırısına karşılık bitkide savunma cevabının başlayabilmesi için öncelikle patojenin bitki tarafından tanınması ve bu tanıma ile savunmada rol alan genlerin ve moleküllerin

aktifleştirilmesi gerekir. Tanıma ile bitki tarafından geliştirilen savunma cevabı 2 temel grupta incelenir.

Elisitör özelliği gösteren patojen kaynaklı lipopolisakkaritler, kitinler, glukanlar ve flagellinler gibi moleküller “patojenle ilişkili moleküler motifler” (MAMPs - “Microbe Associated Molecular Patterns veya PAMP- “Pathogen Associated Molecular Patterns”) olarak tanımlanır. PAMP ve MAMP’lerin bitki yüzeyindeki “patern tanıma reseptörleri” (PRR) tarafından tanınması ile bitkide bazal savunma sistemi harekete geçirilir. Bu şekilde oluşan immünite ise PAMP/MAMP-tetiklenmiş immünite (PTI) olarak tanımlanmaktadır [60], [61]. Örneğin, RLK-FLS2 (Receptor-Like protein Kinases-Flagellin Sensing 2) *Arabidopsis*’te en iyi karakterize edilmiş patern tanıma reseptörüdür ve direk flagellin’in (flg22) epitopunu bağlar. Flg22’nin tanınması üzerine, hücre içi sinyal başlar. Hücrel homeostazis içerisindeki apoplastın alkalinizasyonunu da içeren hızlı değişimlerin sonucunda hücre içi kalsiyum seviyesi, diğer iyon akışları, reaktif oksijen türlerinin (ROS) gelişimi, kinazlar gibi çeşitli moleküllerin ve genel savunma reaksiyonlarının aktivasyonu artar [62]. Erken cevabın ardından antimikrobiyal bileşiklerin üretim ve salgısı, hücre duvarının güçlenmesi, hormon sentezi ve enfeksiyon bölgesinden uzak doku ve hücreler için sistemik dayanıklılık sinyallerinin başlangıcı vasıtasıyla bir savunma cevabı düzenlenir. PTI genel olarak zayıf bir immün yanıt oluşturmakla birlikte birçok patojen için ileri kolonizasyonu durdurması açısından kritiktir [60].

Patojende, *Avr* (avirülens) genleri tarafından kodlanan efektör proteinleri PTI sinyallerini ve bu yöndeki cevabı baskılama özelliğine sahiptir. Günümüze dek karakterize edilmiş birçok fitopatojenik efektör, konukçu savunma proteinini ve süreçlerini hedefler. Gram negatif bakterilerdeki T3SS (Type III Secretion System) efektörünün virülens etkisi memelilerde ve bitki patojenlerinde iyi bilinmektedir [168]. Efektör proteinler konukçu hücrelerine girdiğinde, bağışıklık sisteminde veya patojen tanımadaki etkin olan proteinleri patojenin virülensliğini arttırmak üzere düzenler. Ayrıca birçok patojen kendi yaşam döngüsüne katkı sağlamak için efektör proteinlere ek olarak küçük toksin molekülleri de salgılar [62].

Bitkide ise patojenin efektör proteinlerini tanıyarak “efektör-tetiklenmiş immünite” (Effector-triggered immunity-ETI) olarak adlandırılan daha güçlü bir savunma cevabının gelişmesine yol açan ve dayanıklılık genlerince kodlanan R proteinleri bulunur (Şekil 1.13). Bu tanıma ve ardından gelişen dayanıklılık cevabı, gene-karşı-gen modeli olarak da ifade edilmektedir ve ırka özgüdür. Bir başka deyişle belli patojen ırkları ancak o ırka özgün R geni taşıyan bitkilerce tanınabilmekte ve ancak bu koşulda bitkinin savunma sistemi aktive edilebilmektedir. Aksi takdirde bitki patojeni tanıyamamakta ve hastalık gelişmektedir [64].



Şekil 1.13 Bitki-patojen etkileşimi ve bitkide gelişen savunma cevabını açıklayan zigzag modeli [60]

PTI: PAMP-Tetiklenmiş Immünite, PAMP: Patojen ilişkili MolekülerMotifler, ETS: Efektör Tetiklenmiş Hassasiyet; ETI: Efektör Tetiklenmiş Immünite

ETI sinyalizasyonu enfeksiyon bölgesinde patojenin yerleşmesini kısıtlar ve sıklıkla hipersensitif cevap (Hypersensitive Response-HR) olarak adlandırılan programlı hücre ölümünü tetikler. ETI tarafından indüklenen HR, bitki ile karşılaşan her patojen için etkili olmayabilir [62]. HR oluşumu salisilik asit üretimini tetikler, ardından PR-1'i (Patojen ilişkili-1) de içine alan birçok savunma ilişkili gen aktive edilir. Tetiklenen savunma cevabı, genellikle hücre zarındaki iyon akışında değişim, ekstraselüler oksidatif patlama, enfeksiyon bölgesi ve etrafında programlı hücre ölümü, bölgesel ve sistemik transkripsiyonel regülasyon ile karakterize edilir. Bütün bu olayların ortak

hedefi, patojenin öldürülmesi veya gelişiminin durdurulması böylece hastalık oluşturmamasının önlenmesidir [65].

Plazma membranı, patojen kaynaklı moleküllerin bitki tarafından algılanması için bir ara yüzey vazifesi görür ve dolayısı ile patojen ile bitki hücresi arasında fiziksel bir bariyer sağlaması açısından önemlidir [66]. Plazma ve organel membran geçirgenliğinde değişimlerin yaşanması genellikle patojen tarafından enfekte olmuş bitki hücrelerindeki ilk saptanabilir yanıttır ve özellikle kalsiyum ve potasyum iyonları gibi elektrolitlerin kaybıyla sonuçlanır. Yani, suda çözünebilen küçük iyonlar ve hücredeki moleküllerde değişimler gözlenir [67]. Geçirgenlikteki değişim, patojenin ürettiği toksinlerin etkisi ile oluşur. Örneğin yulaf yapraklarında *Helminthosporium victoriae* tarafından üretilen ve konukçuya özelleşmiş bir toksin olarak bilinen victorin, bir membran proteinine bağlanır ve membranın geçirgenliğini değiştirerek yapraklarda kloroz ve nekroz oluşumuyla yaprak lekesi denilen hastalığa sebep olur [48]. Patojenler konukçu hücrenin transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarını etkilemek için de çaba sarf etmektedir. Bu etki sonucunda bitkinin metabolizmasında patojen yararına bir değişim meydana gelir. Meydana gelen bu değişim, bitki sekonder metabolizmasında basit bir adaptasyona yol açar. Patojen bu şekilde kendisine yararlı kimyasalların üretimini arttırmayı amaçlar [48].

Hastalık oluşumu için gerekli olan bitki, patojen ve çevre arasındaki etkileşim sonucu, bitkinin fizyolojisi üzerinde patojenin etkilerine bağlı olarak semptomlar gözlenmektedir. Fotosentez bitkilerin esas öncelikli fonksiyonudur ve her patojen bu sürece müdahale eder. Bitkinin yaprak ve gövde gibi organlarında kloroz (sararma) ve nekroz (kahverengileşme ve ölüm) şeklinde belirtiler bu fonksiyonların baskılandığının göstergesidir. Sadece fotosentezin zayıflatılmasıyla bile bitki dokularının yumuşamasına sebebiyet vererek diğer bitki zararlısı ve patojenlere karşı hassasiyetinin artmasına neden olunabilmektedir [48].

Patojenler konukçu bitkinin vasküler sistemleri içerisindeki su ve besin elementi taşınımını etkileyebilmektedir. Bu da bitkilerin yüzey kısımları ile terlemeleri veya hasta kökler vasıtasıyla besin elementleri ve suyun zayıf alınımına etki edebilmektedir.

Bu nedenle vasküler sistemdeki yavaş translokasyon bitkiyi solmaya, kloroza ve hatta nekroz oluşumuna kadar götürebilmektedir [48].

Bitkilerde genel reaksiyon olarak gerçekleşen solunum, çoğu bulaşıcı hastalıklar sırasında artmaktadır. Genellikle solunumun artışı, enfekte olmuş konukçu dokuda zarara temel bir yanıt olarak ortaya çıkar. Oksijen alınımının ve solunum enzimlerinin aktivitesinin artışı; sıcaklıkta hafif bir artışa, enfeksiyon noktasının etrafında metabolit birikimine ve hatta konukçu dokusunun kuru ağırlığının artmasına yol açar [48].

Patojenlerin konukçudaki bir diğer etkisi de bitki hormonlarının fazladan üretilmesine neden olmasıdır. Bitki hormonlarındaki bu değişim patojenin konukçu metabolizmasını etkisi altına alması ya da patojen kaynaklı uyarıların etkisiyle bitki büyüme hormonlarının veya analoglarının fazlaca üretiminden kaynaklanabilmektedir. Örneğin *Brassica* cinslerinde beyaz pas diye bilinen hastalığa sebep olan *Albugo candida* enfekte ettiği bitkide indol asetik asit (IAA) üretiminin artmasına neden olur [48]. Yine buğday ve *P. graminis* etkileşiminde olduğu gibi IAA oksidaz inhibisyonuyla IAA indirgenmesi azaldığından bitkide IAA artışı görülmektedir [68]. IAA ise esas büyüme hormonu oksinin en bilinen formudur ve apikal dominanside (yanal tomurcuklanmanın inhibisyonu), vasküler doku oluşumunda, yaprak ve meyve dökülmesinin önlenmesinde, etilen sentezinin uyarılmasında, çiçeklenmenin engellenmesi ve teşvikinde, meyve oluşumunun uyarılmasını kontrol etmede önemli bir hormondur. Bunun yanı sıra IAA'nın bitki hücresi membranına absorpsiyonu membran geçirgenliğini de etkilemektedir [68]. Bu açıdan bakıldığında patojen, konukçusunda IAA artışına sebep olarak bitki dokusu içerisindeki gelişiminde kendisine avantaj sağlayabilmektedir.

1.1.5 Bitki-Patojen Etkileşimine Moleküler Yaklaşımlar

Hastalık kontrolünde dayanıklı çeşitler ile yetiştiricilik yapılması en etkili, ekonomik ve çevreye duyarlı metottur [27]. Ancak buğday gibi büyük ve karmaşık genoma sahip bitkilerde klasik yöntemlerle dayanıklı çeşitleri geliştirmek uzun zaman alan (13-14 yıl) ve yoğun emek gerektiren bir süreçtir. Moleküler biyolojinin sunduğu olanaklardan yararlanmak daha hızlı ve daha etkin kalıcı mücadele programlarının geliştirilmesine olanak sağlar. Bu amaçla çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Bu çalışmaların önemli

kısmını dayanıklılıktan sorumlu genlerin belirlenmesi, tanımlanması ve klonlanmasına yönelik genetik çalışmalar, diğer önemli kısmını ise dayanıklılık ve hassasiyet cevabının gelişiminde rol alan biyomoleküllerin tanımlanması, işlev ve etkileşimlerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar kapsar [25].

Bitki hastalıklarının çoğunluğu için hassasiyet mekanizmasının genetiği dayanıklılığa göre daha az çalışılmıştır ve bu konuda daha az bilgi mevcuttur. Ancak bitki-patojen etkileşiminde hastalık gelişimine etki eden gerek patojen kaynaklı gerekse bitki kaynaklı gen ve gen ürünlerinin hassasiyet cevabını nasıl etkilediğinin anlaşılması daha etkili mücadele yöntemlerinin geliştirilmesinde ve özellikle tarımsal ilaçlar için hedef moleküllerin belirlenmesinde oldukça önem taşımaktadır [69], [70].

Konukçu hassasiyeti genel olarak dayanıklılık kazancı veya kaybı bağlamında incelenir [72] ve patojenler genellikle hastalık gelişimine aşamalı olarak katkı sağlayan virülens efektör faktörlere sahiptir. Konukçu hassasiyetiyle ilişkili genlerin büyük oranda bilinmediğine dikkat çeken Yang vd. [72], hassasiyet mekanizmasının da dayanıklılık mekanizması gibi gene karşı gen modeline göre düzenlendiğini öne sürmüştür. Yapmış oldukları bu çalışmada bakteriyel tip III efektör proteini, genetik olarak dominant çeltik geni Os8N3'ün anlatımının artmasına neden olmuştur. Aynı şekilde, yulafta viktorya yanıklığında da hassasiyetin, konukçuda tek dominant lokus ve patojen türevli konukçu seçici toksin (Host-Selective Toxin-HST) aracılığı ile gene karşı gen modeline göre gerçekleştiği belirtilmiştir. Viktorya yanıklık hassasiyeti ve pas dayanıklılığı aynı gen tarafından düzenlenir ve hastalık hassasiyetinin fizyolojisi, dayanıklılığı andırır. Dayanıklılık ve hassasiyet cevabı arasındaki benzerliklerin incelendiği çalışmada, R geni ailesine bağlı LOV1 geni hassasiyet lokusu olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla R genlerinin hastalığa karşı hassasiyette de önemli rol alabileceği bildirilmiştir [69].

Buğday-*Puccinia striiformis* (*Pst*) ilişkisine yönelik yapılan moleküler çalışmaların önemli bir kısmını *Yr* dayanıklılık genlerinin belirlenmesi, haritalanması ve bu genlerle bağlantılı markörlerin bulunması oluşturmaktadır. Bu çalışmalarda genel amaç yeni dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılacak genomik verilerin ortaya konmasıdır. [25]. Fakat bitkide sarı pas hastalık gelişiminden sorumlu olduğu bilinen spesifik bir gen olmadığı için genomik çalışmalar dayanıklılıkla ilişkilidir. Oysa *Pst*'e karşı daha etkin ve

kalıcı mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi için patojenisitenin, virölens faktörlerin ve bunların bitkide meydana getirdiği moleküler cevabın da anlaşılması önem taşımaktadır. Bu amaçla hastalık gelişimini ve patojen cephesini irdeleyen çalışmalar son yıllarda artarak devam etmektedir. Fakat *Pst* genom sekans bilgisinin eksikliği bu patojen odaklı çalışmaların en büyük kısıtlarındandır. *P. graminis* f. sp. *tritici*'nin genom sekansı yakın zamanda yayınlanmış, *P. tritici*'nin ise tüm sekanslaması yapılmış ve annotate edilmiştir [73]. Broad Institute' de *Puccinia* Grubu Sekanslama Projesi (*Puccinia* Group Sequencing Project) kapsamında *Pst* genom projesi üzerinde çalışmalar sürmektedir ve bir kısım genomu yakın zamanda tamamlanmıştır. Cantu vd. [73], Next Generation Sequencing yöntemini kullanarak *PST-130* ve *PST-78* gibi farklı *Pst* patotiplerinin genom sekanslamalarını yayınlamışlardır. Genom sekanslama çalışmalarıyla ortaya konan birçok aday patojenisite ve virölens geni hastalık kontrolü için potansiyel hedef konumundadır ve mikrobiyal patojenite çalışmaları dünya çapında efektörler üzerine yoğunlaşmıştır [74]. Obligat biyotrofik funguslarda son zamanlardaki genom sekanslama çalışmaları biyotrofik gelişim esnasında eksprese olan salgı proteinlerinin potansiyel efektörler olabileceğini ortaya koymuştur [75].

Bitkilerde doğal savunma mekanizması yüzlerce genin anlatımının arttığı veya azaldığı güçlü bir transkripsiyonel ve translasyonel cevabı gerektirir. Fakat bitkilerin savunma esnasında transkriptomlarını nasıl düzenledikleri ya da transkripsiyonel düzenlenmelerinin hangi fonksiyonları yerine getirdiğinin aydınlatılması amacıyla gerçekleştirilen işlevsel genomik çalışmalar artarak devam etmektedir. Son 25 yılda bu tip çalışmalarla bitkinin yanı sıra birçok patojen geni de keşfedilmiş ve farklı bitki hastalıklarının moleküler temellerinin anlaşılmasında önemli adımlar atılmıştır. Elde edilen bu fonksiyonel veriler genom dizi bilgileriyle birleştirilerek yeni veri tabanlarının oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Böylece gen delesyonlarının etkileri, gen transferleri ile overekspresyon ya da RNAi (RNA interference) gibi gen susturma yöntemleri kullanılarak ters-genetik yaklaşımlarla olası fonksiyonel genlerin hastalık veya dayanıklılıktaki rolleri ortaya konmaktadır [76]. Örneğin patojenin belli hayat döngüsü ya da enfeksiyon aşamalarından oluşturulan cDNA kütüphanelerinin sekanslanması da bitki patojen etkileşiminin anlaşılmasında oldukça etkindir. Elde edilen EST'lerin (Expressed Sequence Tags) ileri analizleri birçok sekansın patojenlikle

veya diğ er patojenlerdeki vir lens genlerle homolojisinin keşfine yol açmıştır. Tahıllardaki pas funguslarına dair EST kütüphaneleri, bu genlerin keşfine ve enfeksiyonun belli evrelerindeki ekspresyon değişimlerinin belirlenmesine katkı sağlamıştır [76]. Buğdayda kahverengi pas [77], [78], kara pas [79], [80] ve sarı pas [81], [82] için EST kütüphaneleri oluşturulmuştur.

Yin vd. [81] 2009 yılında enfekteli buğday yapraklarından izole ettikleri hostoryalardan oluşturdukları *Pst* cDNA kütüphaneleri ile salgı proteinlerini kodladığı varsayılan 15 geni tanımlamışlardır ve enfeksiyon sürecinde indüklenen 6 geni belirlemişlerdir. Bu genler içerisinde calcium/calmodulin-dependent protein kinase, chitinase, ubiquitin ligase gibi önemli proteinlerle homoloji gösteren dört genin (*PSTha14i19*, *PSTha11n16*, *PSTha5a1* ve *PSTha5G19*) enfekte yapraklardaki ekspresyonunda yüksek seviyede artış gözlenmiş ve *PSTha14i19* geninin vitamin B1 biyosentezinde görev aldığı belirtilmiştir. 2011 yılında yayınlanan bir başka çalışmada [83], eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) tekniğini kullanarak, üç olası salgı protein genine (*PstSP11L10*, *PstSP2C7* ve *PstSP11P10*) ait tam uzunlukta sekanslar elde edilmiş, fungal gelişimin çeşitli aşamalarında ve enfeksiyon sürecinde ekspresyon profilleri ortaya konmuştur.

Ling vd. [84] *Pst*'ye ait tam uzunlukta cDNA kütüphanesi oluşturarak, cDNA klonlarına ait sekansları diğer fungusların mevcut raporlanmış genleri ile karşılaştırarak ilgili genlerin fonksiyonlarını belirlemeyi amaçlamıştır. Çalışmanın sonucunda *Pst*'ye ait amino asit metabolizması, hücre savunması, protein modifikasyonu gibi farklı mekanizmalar ile ilişkilendirilen 51 gen tanımlamışlardır. Bunlar içerisinde "Cell wall glucanase", "Differentiation-related/infection protein" ve "Pectin lyase" gibi enfeksiyonla ilişkili proteinlerle yüksek homoloji gösteren proteinler de rapor edilmiştir. Buğday ve *Pst* arasındaki uyumlu etkileşimin incelendiği bir diğer çalışmada [85] da *Pst* patojenisite genleri ve buğday savunma genlerinin araştırılabileceği yeni bir veri tabanı kurulmuştur (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/software>). Ayrıca pas hostoryasından izolasyonla oluşturulan cDNA kütüphanesi ve sonrasındaki sekans analizleriyle birlikte hostorya yapısının moleküler düzeyde fonksiyonunun anlaşılmasında, besin alınımı ve efektör proteinlerin taşınımındaki önemli rolleri ortaya konmuştur.

Buğday ve *Pst* etkileşiminin transkriptom düzeyinde incelendiği bir başka çalışmada sarı pas dayanıklılık geni *Yr5*'in uyumlu ve uyumsuz etkileşi sırasında transkript düzeyindeki değişimi incelemek üzere Buğday Gen Çipi (Wheat GeneChip) kullanmışlardır. Her iki etkileşimde toplamda 242 transkript tanımlanmış ve bu transkriptler içerisinde 61 tanesinin uyumsuz etkileşime (dayanıklılık) özgün hipersensitif cevaba (HR), 19 tanesinin ise sadece uyumlu (hassasiyet) biyotrofik etkileşimde ait olduğu bildirilmiştir. Hastalık gelişimine özgü bu transkriptlerin içerisinde *Yr5*, *Lr10* gibi dayanıklılık genlerinin algılanmasında etkin olan Protein Kinase ve metabolizma ile ilişkili Cytochrome P450 gibi önemli proteinlerle eşleşen transkriptler de tanımlanmıştır [86].

Bu tip büyük işlem hacimli bütünsel yaklaşımlar sonucunda bitki-patojen etkileşiminde ekspresyonu değişen genler belirlenirken bir yandan da tek tek bu genler üzerinde fonksiyonel çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalardan birinde, *Pst* enfekteli buğdaydan elde edilen TaARD (aci-reductone-dioxygenase) geni incelenmiş ve bu genin etilen sentez yolağında yer aldığı ve stres cevabında etilen sinyallerinden faydalandığı gösterilmiştir. Etilen üretimi genellikle patojenin bitkiye saldırması sonucu bitkideki erken cevap olarak görülür. Etilen savunma ile ilişkili genlerin düzenlenmesinde ve hastalık semptomlarının gelişiminde sinyal görevi görmektedir [87].

Bir diğer çalışmada [88], Suwon 11 çeşidine *Pst* inokulasyonu sonrasında, programlı hücre ölümünde önemli role sahip metakaspaz geni incelenmiştir. *Triticum aestivum* metakaspaz 4 (TaMCA4) ekspresyonunun susturulması avirülent *Pst* ırkı karşısında Suwon 11 çeşidinin hassasiyetini arttırmıştır. Çalışmanın sonucunda buğdayda sarı pas dayanıklılığında TaMCA4'ün olumlu bir rolü olduğu rapor edilmiştir.

Buğdayda ırka özgü *Pst* uyumlu ve uyumsuz etkileşiminde hücresel ve transkripsiyonel cevabın araştırıldığı bir çalışmada, *Yr1* dayanıklılık geninin iki fazlı programlı hücre ölümüne (Hypersensitive Cell Death-HCD) yol açtığı belirtilmiştir [89]. İlk fazda fungal gelişim gözlenirken ikinci fazda bitki savunma mekanizması harekete geçmektedir. Dolayısıyla hassas çeşit açısından düşünüldüğünde bu durum patojenin koloni oluşturmaya ve sporulasyon kapasitesini arttırması için gerekli süreyi uzatacağından [90], hastalık gelişimi süresinde patojene avantaj sağlayabilmektedir.

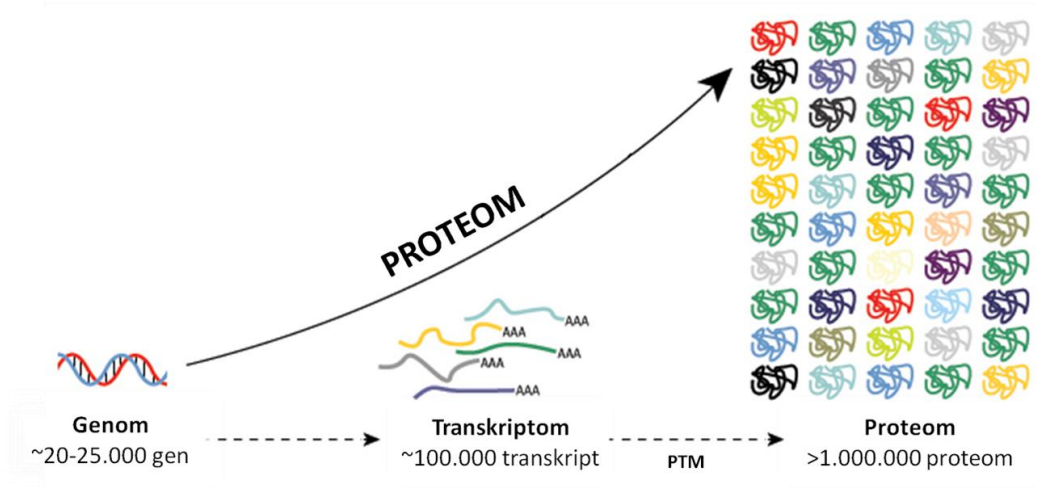
Proteomik yaklaşım ile bitki-patojen etkileşimi gibi son derece karmaşık olan biyolojik olayların aydınlatılmasına yönelik çok daha somut veriler elde edilmektedir. Bu nedenle son yıllarda bitki-patojen etkileşimine yönelik moleküler çalışmalar proteomiğe kayarken, bitki proteomiği alanında ki çalışmaların da önemli bir kısmını bitki-patojen etkileşimi çalışmaları oluşturmaktadır. Ancak buğday ve *Pst* etkileşimlerini konu alan çok az sayıda proteomik çalışmaya rastlanılmıştır. Bunların ilki 2011 yılında yayınlanmıştır [91]. Virü lent ve avirü lent *Pst* ırklarıyla inokü le edilen buğdayda inokü lasyon sonrası 24. ve 72. saat ö rnekler 2-DE ve MALDI-TOF MS ile yapılan analizler sonucunda ekspresyonu de ğ iş en 23 protein tanı mlanmıştır ve bu proteinler fotosentez, antioksidan, savunma, sinyal iletimi ve metabolizma ile iliş iklı olarak sınıflandırılmış tır. Fotosentez ile ilgili proteinler iç erisinde yer alan oxygen-evolving complex protein (OEE₂)'inin uyumlu etkileş imde ekspresyonun azalması *Pst* enfekteli hü crelerde HR'ın hızlandırılmasına, patojenin yayılmasının engellenmesine ve enfeksiyona uğ ramamış hü crelerdeki savunma iç in gerekli olan lokal veya sistemik sinyallerin tetiklenmesine katkı sağlayabilece ğ i ş eklinde yorumlanmıştır. Antioksidan savunmasıyla ilgili proteinler iç erisinde, ekspresyon seviyesi artan ascorbate peroxidase (POD) ve dehydroascorbate reductase (DHAR) proteinlerinin enfeksiyon sırasında olu ş an ROS'nin yıkımında rol alabilecekleri bildirilmiştir. Uyumsuz etkileş ime ö zğ ü savunma cevabı ve sinyal iletimi ile ilgili olan ve anlatımı artan cysteine-rich receptor-like protein kinase 5 tanı mlanmıştır. Bu proteinin de savunmaya y ö nelik sinyal iletim y olaklarındaki mekanizmalarda rol aldığ ı bildirilmiştir. Metabolizma ile ilgili olarak da cysteine synthase (CYS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), chloroplast 30S ribosomal protein, S10 predicted protein ve 26S protease regulatory subunit 7 gibi hü cresel metabolik y olaklar ile ilgili oldu ğ u d ü ş ünö len proteinler tanı mlanmıştır.

1.1.6 Proteomik

Son yıllarda genomik ve işlevsel genomik yöntemlerle birçok genin fonksiyonu tanımlanmasına rağmen tam olarak aydınlatılamayan biyolojik süreçler için araştırmacılar, bu süreçlerde doğrudan rol alan proteinler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu gelişmeler genomik sonrası çağda proteomiks, transkriptomiks, metabolomiks ve

matematiksel modelleme sistemlerini de içeren sistem biyolojisi yaklaşımını doğurmuştur [92].

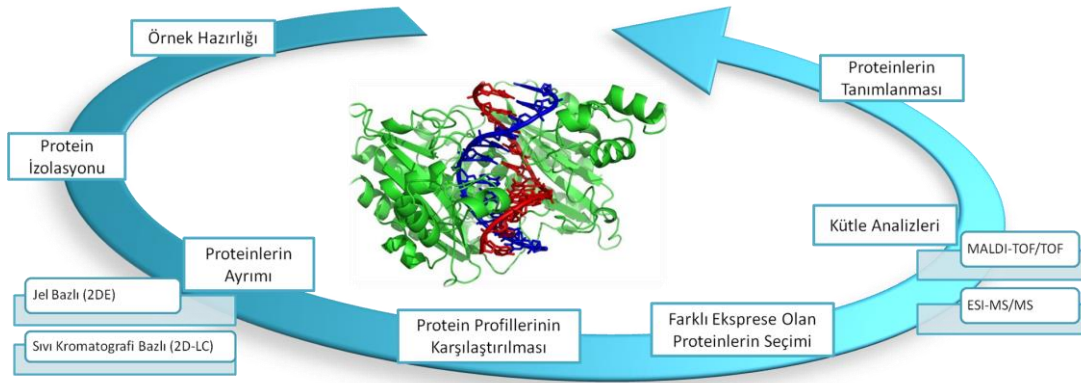
Genomik, işlevsel genomik ve transkriptomik yaklaşımlarla enfeksiyon esnasında farklı ekspresyon gösteren birçok gen tanımlanmasına rağmen bunların fonksiyonel olup olmadığı halen tam olarak açık değildir. Transkripsiyonel değişimler, post translasyonel modifikasyonlar ve proteinlerin kararlılığındaki farklılıklardan dolayı protein seviyesindeki değişimleri yansıtmamaktadır [93]. Ayrıca bir gen, farklı biyolojik işlevlere sahip farklı proteinler kodlamakta ve bu proteinler translasyon sonrası değişimlere uğramaktadır (Şekil 1.14). Çoğu durumda post translasyonel modifikasyonlar proteinin fonksiyonu ile doğrudan ilişkilidir ve genomik/işlevsel genomik yaklaşımlarla bu bilgilere ulaşmak mümkün değildir.



Şekil 1.14 Genom-transkriptom ve proteom arasındaki bağlantı

Proteom; belli bir zaman ve koşulda, bir organizmanın sahip olduğu ve ifade ettiği tüm farklı proteinlerin bir toplamıdır. Proteomik sözcüğü ise bir biyolojik sistemdeki belirli bir koşulda ve belirli bir zamandaki her bir proteini tanımlamayı, gen anlatım profilini ortaya koymayı, hücre içi yerleşimini, aktivitesini, kontrol mekanizmalarını (regülasyonunu), transkripsiyon sonrası düzenlemelerini, moleküler etkileşimlerini, üç boyutlu yapısını ve işlevini belirlemeyi amaçlamaktadır [94]. Proteomik aynı zamanda spesifik hastalıklar, toksik ajanlar veya enfeksiyonlar gibi pek çok uyarana karşı verilen cevapta rol alan proteinlerin ve karşılıklı interaksiyonlarının belirlenmesi üzerinde çalışan, multidisipliner teknoloji gerektiren bir bilimdir [95].

Bir proteomik çalışma genel olarak, örnek hazırlığı ve ardından uygun yöntem ile total protein izolasyonu ile başlar. İzolasyonu takiben kompleks protein karışımındaki proteinlerin tek tek ayırımı yapılarak kontrol ve test örneklerine ait proteinlerin karşılaştırılması, farklı eksprese olanların seçilmesi ve seçilen proteinlerin tanımlanması gerekir. Bir total protein karışımındaki proteinlerin yüksek çözünürlükte ayırımı, proteomik çalışmanın başarısını etkileyen en önemli aşamadır. Bu aşamada iki boyutlu jel elektroforez sistemleri kullanılabileceği gibi yüksek çözünürlük ve geri kazanabilirlik avantajlarını içeren sıvı kromatografi sistemleri (LC) de kullanılabilmektedir. Her iki yöntemle de 2 boyutlu ayırım sonucunda oluşturulan kontrol ve test grubu protein profilleri karşılaştırılır ve farklı anlatım yaptığı tespit edilen proteinler tanımlanmak üzere seçilir. Daha sonrasında seçilen bu proteinler peptit parçalarına ayrılır ve kütle spektrometre (MS) analizleri ile moleküler kütleleri belirlenir. Bu analizler sonucunda elde edilen kütle verileri ve amino asit dizi bilgisi, ilgili protein veri tabanlarında taranarak proteinlerin tanımlanması sağlanır. Tanımlanan proteinler proteomik sonrası yapı tayini veya işlevsel validasyon gibi çalışmalarla desteklenir. Genel bir proteomik çalışma akışı Şekil 1.15’de özetlenmiştir.



Şekil 1.15 Genel bir proteomik çalışmanın aşamaları

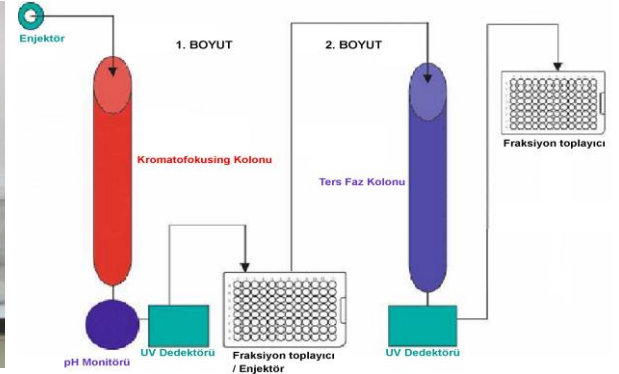
1.1.7 2D-LC Sistemi

Bir örnekten elde edilen kompleks bir proteomun incelenmesinde en kritik aşama, bu karışımı oluşturan proteinlerin yüksek çözünürlükte ve tekrarlanabilir şekilde ayrılmasıdır. Yaygın olarak kullanılan iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) zayıf çözünürlük, tekrarlanabilirliğinin düşük olması, uygulama zorluğu ve örnek

sayısına bağılı olarak uzun zaman gerektirmesi gibi bir takım dezavantajları içermektedir. Yöntemin bir diğ er dezavantajı da sadece suda     nen proteinlerin ayırımına olanak vermesidir. Oysa suda     nmediğı için kaybedilen hidrofobik proteinler, bir proteomun önemli bir kısmını oluşturur ve  oğ  düzenleyici proteinlerdir. Ayrıca 2D-PAGE ekspresyon seviyesi düşük proteinlerin belirlenmesinde de yetersiz kalmaktadır [96], [97].

Bu dezavantajlar d         nde, gen anlatımlarının en doğ ru şekilde ortaya konması için daha etkin protein ayırma sistemlerine gereksinim duyulmuş ve alternatif olarak iki boyutlu sıvı kromatografi (2D-LC) sistemleri geliştirilmiştir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniğı ile fraksiyonlama sistemi birleştirilerek oluşturulmuş 2D-LC sistemleri son yıllarda yeni nesil teknolojiler arasında yer almaktadır. Bu sistemin önemli özelliklerinden biri, 2D-LC fraksiyonlarında ayrılan proteinlerin analizi ve örnekler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için geli mi  yazılım programlarının da sisteme dahil edilmiş olmasıdır. 2D-LC'nin bir diğ er avantajı da, ham protein    tlerinin birkaç adımda safla tırıldıktan sonra analiz edilmesidir. Böylece protein profillerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen verilerin, 2D-PAGE yöntemine oranla daha tekrarlanabilir ve güvenilir olması sağlanır. Ayrıca hidrofobik yapıda ve düşük anlatımlı proteinler 2D-LC yöntemi ile ayrılabilir [24], [98].

Sağlamı  olduğ  avantajlar sebebiyle bu tez çalışmasında bir 2D-LC sistemi olan ProteomeLab PF2D (Protein Fractionation 2 Dimentional) sistemi kullanılmıştır. PF-2D sisteminde, proteinler birinci boyutta izoelektrik noktalarına (pI) göre chromatofocusing (CF) prensibiyle, ikinci boyut ayırımında ise yüksek performanslı ters faz kromatografi (High Performance Reversed Phase Column-HPRP) prensibiyle hidrofobisite özelliklerine göre ayrıştırılarak fraksiyonlanmaktadır ( ekil 1.16). Sistemin  alı ması, I. ve II. boyut ayırım konusundaki tüm detaylar Bölüm 2.3'de sunulmuştur.



Şekil 1.16 Beckman Coulter PF2D Sistemi ve Çalışma Prensibi

1.2 Tezin Amacı

Dünyanın önde gelen buğday üreticileri arasında yer alan ülkemizde, buğdayda yaşanan yüksek miktarlardaki verim kayıplarının önemli nedenlerinden biri sarı pas hastalıklarıdır. Bunlar arasında *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'nin neden olduğu sarı pas hastalığı, tüm dünyada 60'dan fazla ülkede ve ülkemizde görülen en tahripkar hastalıklardan biridir. Günümüzde genellikle fungusit uygulamaları ve dayanıklı çeşitlerin kullanımı ile hastalığın meydana getirdiği zararlar kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Ancak patojen, mutasyonlarla kısa sürede farklı virülent özelliğe sahip yeni ırklar oluşturmakta ve rüzgarla taşınarak hızla yayılabilme ve yeni epidemiler oluşturabilme özelliğine sahiptir. Dolayısıyla hastalıkla mücadelede daha hızlı ve etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine gereksinim vardır. Bitki-patojen etkileşiminin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik sürdürülen çok sayıda araştırmanın ortak hedefi, geliştirilecek mücadele yönteminde kullanılabilecek hedef gen ve gen ürünlerinin belirlenmesidir. Aynı ortak hedef çerçevesinde planlanan tez çalışması kapsamında, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'nin etmeni olduğu sarı pas hastalığının gelişimi sırasında işleyen karmaşık biyokimyasal mekanizmaların çözümlenmesine önemli katkılar sağlayacak protein düzeyindeki bilgilerin ortaya konması, özellikle de bu mekanizmaların kritik noktalarında görev alan protein ve enzimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Buğday tüm dünyada üretimi ve tüketimi en yaygın tarımsal ürünlerden biridir. Buğday üretiminde global bir tehdit olan ve ciddi seviyelerde kalite ve verim kayıplarına yol açan sarı pas hastalığına karşı daha hızlı ve etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilebilmesi için dayanıklılık ve hassasiyet mekanizmalarının aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda dayanıklılık cevabı incelenmiş iken, özellikle son yıllarda hastalık gelişimi sürecinin de son derece önemli olduğunun fark edilmesi, araştırmacıları bu alandaki çalışmalara da yöneltmiştir. Sunulan tez çalışması kapsamında hassas çeşit Seri82’de hastalık gelişiminde rol alan hem fungal hem de bitkisel proteinler tanımlanmıştır. Elde edilen bulguların hem hastalık oluşum mekanizmasının daha iyi anlaşılması hem de hastalıkla mücadele amaçlı gerçekleştirilecek çalışmalar için önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçların daha hızlı ve etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesinde kullanılabilecek hedef geni/gen ürünlerini oluşturabileceği de beklenmektedir.

MATERYAL METOD

2.1 Bitki Materyalinin Hazırlanması

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

2.1.1 Bitki Materyali

Tez çalışmasında bitki materyali olarak, TAGEM'e bağlı Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ATAE)'den temin edilen, Meksika orijinli ve ülkemize adaptasyon sağlamış, sarı pasa karşı hassas, kışlık ekmeklik buğday çeşidi "Seri82" (Şekil 2.1) kullanılmıştır.



Şekil 2.1 Tez çalışmasında kullanılan sarı pasa hassas Seri82 çeşidi [99]

2.1.2 Patojen Kaynağı

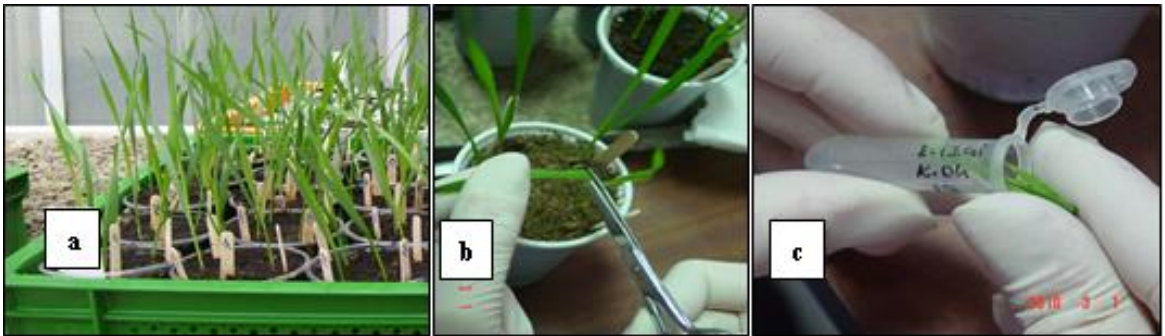
Tez kapsamında, ülkemiz İç Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösteren, sarı pas hastalığı etmeni *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) fungusu patojen kaynağı olarak kullanıldı. *Pst* izolatları Yr2, Yr6, Yr7, Yr8, Yr9, Yr11, Yr12, Yr17, Yr18, Yr27, YrA+ genlerine virü lent iken Yr1, Yr5, Yr10, Yr15, Yr24, YrSP, YrCv genlerine avirü lent özelli ktedir. Patojenin ürediosporları, TARM Ankara, Haymana İkizce Araştırma ve Uygulama Çiftliği Hastalıklara Dayanıklılık Islahı Bölümü tarlasından 2009 Mayıs-Haziran aylarında toplandı ve TARM seralarında, kontrollü koşullarda, hassas çeşitler üzerinde çoğaltıldı. Çoğaltılan sporlar tez çalışmasında kullanılacak bitki materyalinin inokülasyonundan hemen önce toplanarak taze olarak kullanıldı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Patojen sporlarının inokülasyon için hazırlanması
(A, B, C; Taze spor üretimi, D; Çoğaltılan ürediosporların mineral yağ ile karıştırılarak inokülasyona hazırlanması)

2.1.3 Bitkilerin Enfekte Edilmesi

Tezde, bitkinin sarı pas etmenine karşı göstermiş olduğu hassasiyet cevabında rol alan proteinleri belirlemek üzere, patojen bulaştırılmış (enfekte) örnekler ile karşılaştırma yapılacak kontrol örnekler arasında, patojen dışında başka bir uyarının bulunmamasına dikkat edildi. Bu amaçla kontrol bitki materyali, enfekte bitki materyali ile aynı zamanda ve aynı biçimde ekilerek aynı fiziksel koşullar altında yetiştirildi. Bitkiler iki yapraklı döneme geldiğinde inokülasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Her bir zaman dilimi için etiketlenen 80 bitkiden 40'ı *Puccinia striiformis f. sp. tritici* ürediosporlarının mineral yağ ile karıştırılarak (10 mg/mL) bitkilere püskürtülmesi şeklinde, diğer 40 bitki ise kontrol amaçlı olarak sadece mineral yağın bitkilere püskürtülmesi şeklinde (mock) inoküle edildi. İnokülasyonu takiben enfekte bitki materyali ile kontrol bitki materyalleri birbirinden ayrı ancak aynı fiziksel koşullara sahip sera koşullarında muhafaza edildi. Çalışma materyalini oluşturan bitkilerde inokülasyonun başarılı biçimde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek üzere bitkiler numaralandırıldı ve her bitkinin birinci yaprağı örnek olarak alınırken diğer yaprağı enfeksiyon cevabını gözlemek üzere bırakıldı (Şekil 2.3). Alınan örnekler derhal sıvı azot içerisinde donduruldu ve protein ekstraksiyonu yapılncaya kadar -86°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Bitki üzerinde bırakılan diğer yaprak ise inokülasyonun başarılı olup olmadığını değerlendirmek üzere 20 gün boyunca gözlemlendi. Bu süreç sonunda tüm bitkilerde tek tek inokülasyon değerlendirmesi yapıldı ve enfeksiyon cevabı aynı şiddette gerçekleşen bitkilere ait yapraklar proteom analizlerinde kullanıldı.



Şekil 2.3 Proteom analizleri için örnek alımı

(a. Her bir bitkinin tek tek etiketlenmesi, b. Yaprak örneklerinin alınması, c. Alınan örneklerin ayrı ayrı etiketlenmiş tüplere yerleştirilmesi)

2.1.4 Enfeksiyon Cevabının Mikroskopik ve Makroskopik İncelenmesi

Enfeksiyon gelişimini gözlemlemek üzere inokulasyon sonrası 5. gündeki yaprak örneklerinden Trypan Blue boyama yöntemiyle (Çizelge 2.1) bitkilerdeki enfeksiyon cevabı incelendi. Enfekte ve kontrol bitkilerden alınan yaprak örneklerinin üzerlerine yıkama solüsyonu A'dan 2.5 mL ilave edilerek bütün gün düşük hızdaki çalkalayıcıda bırakıldı. Ertesi gün A solüsyonu dökülerek yerine 2 mL B solüsyonu koyuldu ve 3 saat düşük hızda çalkalandı. Daha sonra B solüsyonu atılıp yerine 2 mL boyama solüsyonu eklendi ve gün boyu düşük hızdaki çalkalayıcıda boya ile muamele edildi. Ertesi gün boyanan yapraklar 2 mL temizleme solüsyonuna alındı ve 2 saat çalkalayıcıda bırakıldı. Boyama işlemi tamamlanan örnekler bir miktar temizleme solüsyonu ile birlikte lam ile lamel arasına konarak ışık mikroskopunda izlendi.

Çizelge 2.1 Trypan Blue boyama yönteminde kullanılan solüsyonlar

Kimyasal/Çözelti Adı	İçeriği	Hazırlanışı
Yıkama solüsyonu A	Asetik asit, Etanol	1 hacim asetik asit ve 3 hacim etanol karıştırıldı
Yıkama solüsyonu B	Asetik asit, Etanol, Gliserol	5 hacim etanol ve 1 hacim gliserol karıştırıldı
Boyama Solüsyonu	Tripan Blue (Sigma B-8026), Laktik asit, Fenol, HPLC'ye uygun su	Suda çözündürülmüş %1 lik tripan mavisinden 0.3 mL, 10 mL laktik asit, 10 mL fenol ve 10 mL distile su ile karıştırıldı
Temizleme Solüsyonu	Gliserol	% 60 gliserol

Enfeksiyonun gözlenmesi için kullanılan mikroskopik yöntemlerin yanı sıra makroskopik gözlem de gerçekleştirildi. Bu amaçla inokülasyonun 16. gününde tüm bitkilerde yaprak yüzeyinde gözlenen belirtiler Mc Neal [100] skalasına göre değerlendirildi.

2.2 Protein Örneklerinin Hazırlanması

2.2.1 Protein İzolasyonu

Bitki örnekleriyle, özellikle bitkinin yeşil kısımlarıyla çalışıldığında elde edilen total proteinlerin yaklaşık %50'sini fotosentezde rol alan RuBisCo (Rubiloz-bifosfat karboksilaz) oluşturur. Bu durum düşük anlatım düzeyine sahip proteinlerin ve RuBisCo ile özdeş pI noktasına sahip olan proteinlerin görüntülenmesini ve tanımlanmasını

engeller. Bu nedenle izolasyon sırasında RuBisCo'yu uzaklaştıran Mg/NP40 yöntemi kullanıldı [101]. Bu yöntemde PEG 4000'in %15'lik konsantrasyonu ile RuBisCo proteinleri çöktürülerek büyük oranda elimine edildi. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler Çizelge 2.2'de verildi.

Çizelge 2.2 Protein izolasyonu için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları

Kimyasal/çözelti Adı	İçeriği	Hazırlanışı
Poli (vinil poli-pirolidon) (PVPP- Fluka 77627)	0.1 g PVPP (1 g doku için)	Her 1 g dokuya 0.1 g PVPP toz olarak ilave edildi.
Lizis Tamponu	0.5 M TrisHCl pH 8.3 (Roche 122010), % 2 Igepal (v/v) (Sigma I7771), 20 mM MgCl ₂ (Sigma M8266), %2 2-Beta Merkaptöetanol, (Applichem A1108), 1 mM PMSF (Fenil metil sülfonil florür) (Sigma P7626)	Tüm bileşenler tartılıp 50 mL dH ₂ O ile çözündürüldü ve son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
%50 PEG4000 (Sigma 95904) (Poli etilen glikol)	%50 PEG4000	50 g PEG4000 50 mL dH ₂ O içerisinde çözündürüldü. 100 mL'ye tamamlandı.
Proteaz İnhibitör Karışımı (Sigma P2714)	30 g bitki dokusu için; serin, sistein, aspartik metalloproteaz ve aminopeptitaz inhibitörü	1 mL dH ₂ O ile çözündürüldü ve 1 g dokuya karşılık 50 µL olacak şekilde kullanıldı.
Çözündürme Tamponu	7.5 M Üre (Sigma U0631), 2.5 M Tiyoüre (Sigma T7875), %12.5 (v/v) Gliserol (Sigma 6279), 62.5 mM TrisHCl pH 7.8, 6.25 mM Tris (2 karboksietil fosfin, TCEP) (Sigma C4706), %12.5 (w/v) n-oktilglukozit (OG) (Sigma 08001)	Bileşenler tartılıp dH ₂ O çözündürüldü ve 50 mL'ye tamamlandı.

İzolasyonda sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

- 1.-86°C'lik dondurucuda saklanan örneklerden sıvı azot içinde muhafaza edilerek 3 g yaprak dokusu bir araya getirildi ve 1 g dokuya karşılık 0.1 g PVPP ilave edildi.
- 2.Yaprak dokuları sıvı azotlu ortamda vibrasyonlu öğütücüde (RETSCH MM301) iyice toz haline getirildi.
- 3.Toz haline getirilmiş olan yaprak dokularının üzerine 30 mL lizis tamponu ilave edildi ve 15 dakika buzda bekletildi.
- 4.Karışım 1076 xg de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek hücre kalıntılarının çökmesi sağlandı ve süpernatant yeni tüpe aktarıldı.

5. Süpernatant üzerine son hacmin %15'i olacak şekilde %50'lik PEG4000 solüsyonu eklendi ve 30 dakika buzda bekletildi. Bekleme sürecinde, karışım 10'ar dakika aralıklarla vortekslendi.
6. Süre sonunda RuBisCo proteinleri 17211 xg de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
7. Asetonda çözünen bileşikleri uzaklaştırmak için yeni tüpe alınan süpernatantın üzerine 4 hacim soğuk aseton ilave edilerek -20°C'de gece boyu bırakıldı.
8. Ertesi gün 23426 xg de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı.
9. Protein çökeltisini yıkamak amacıyla pellet üzerine 10 mL soğuk aseton ilave edilip vortekslendi ve en az 30 dakika -20°C'de bırakıldı.
10. 4303 xg de +4°C'de 10 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atıldı. 9. ve 10. adımlar pellet temizlenene ve süpernatant renksizleşene kadar 3-4 kez tekrar edildi.
11. Son yıkamadan sonra üst sıvı atıldı ve protein çökeltisi aseton kokusu gidene kadar (yaklaşık 30 dakika) çeker ocakta kurumaya bırakıldı.
12. Pellet kuruduktan sonra 1 mL çözündürme tamponu ve 150 µL taze hazırlanmış proteaz inhibitör karışımı eklenerek çözündürüldü. Çözünmeyi artırmak üzere 7 W'da 5 kez 5 saniye sonikasyon (MSE soniprep 150) uygulandı.
13. 30.000 xg de 22 °C'de 30 dakika santrifüj edildi.
14. Protein karışımı, ultrasantrifüj tüplerine aktararak 100.000 xg de 20 °C'de 1 saat santrifüj (Beckman Coulter Optima MAX) edilerek düşük molekül ağırlığına sahip moleküller çöktürülerek uzaklaştırıldı.
15. Süpernatantın 100 µL'si protein konsantrasyon tayini ve tek boyutlu SDS-PAGE analizi için ayrıldı. Kalan kısmı LoBind (Eppendorf, 022431081) tüplere alınarak PF2D sisteminde iki boyutlu ayırımı yapılmaya kadar -86°C'de saklandı.

2.2.2 Protein Miktar Tayini ve SDS-PAGE Analizi

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu modifiye Bradford yöntemi ile belirlendi [102]. Bu yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek

renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Öncelikle bovine serum albumin (BSA) proteini ile 0-300 µg/mL konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı (Çizelge 2.3). Standartlar, analiz edilecek proteinlerin çözöndüröldüğü çözöndürme tamponunda hazırlandı. Çözöndürme tamponundaki kimyasalların Bradford reaktifi ile etkileşimini en aza indirmek için hem örnekler hem de standartların hazırlığında kullanılan çözöndürme tamponu HPLC'ye uygun su ile 1:10 (v/v) oranında sulandırıldı.

Çizelge 2.3 BSA standartlarının hazırlanması

BSA Standartları (µg/mL)	Stok BSA (1 mg/mL)	1/10 (v/v) Sulandırılmış Çözöndürme Tamponu
0	-	500 µL
50	25 µL	475 µL
100	50 µL	450 µL
150	75 µL	425 µL
200	100 µL	400 µL
250	125 µL	375 µL
300	150 µL	350 µL

Örnek ve standartlar hazırlandıktan sonra 10'ar µL alınarak 3'er tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaların kuyucuklarına koyuldu. Üzerlerine 200 µL 1x Bradford reaktifi (Bio-Rad 500-0006) eklendi. Mikropalaka 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda oluşan renkli bileşğin 595 nm'deki absorbansı mikropalaka okuyucu ile (Bio-Rad 3550) ölçöldü. Standartlara ait veriler kullanılarak standart grafik oluşturuldu. Örneklere ait absorbans değeri kulllanılarak örneklerin protein konsantrasyonları bu grafikten yararlanılarak hesaplandı.

İzole edilen proteinlerin kalitatif analizi, tek boyutlu SDS-PAGE ile gerçekteştirildi [103].

2.2.2.1 Jelin Hazırlanması

Elektroforezde kullanılan tüm cam malzemeler ve jel kaseti sıvı deterjan ile yıkanıp ardından durulanarak distile sudan geçirildi. Bu işlem sonrasında jel kaseti için gerekli cam plaklar etanol ile silindi ve kağıt mendil (kimwipes) ile partiköl kalmayacak şekilde kurulandı. Jel kaseti, çalışmada kullanılan elektroforez sisteminin kitapçığında belirtildiği şekilde hazırlandı. %12.5 akrilamid içeren ayırma jelini hazırlamak üzere 2.5 mL TrisHCl (1.5 M, pH 8.8), 2.26 mL distile su (dH₂O), 10 µL SDS (% 10 w/v), 4.17 mL Akrilamid/Bisakrilamid (29:1 w/w) iyice karıştırılıp 15 dakika vakumda bekletildi. Ardından karşıma polimerizasyon başlatıcı % 10 (w/v) amonyum persölfat (APS, Sigma

A9164) ve katalizör Tetrametiletilediamin (TEMED, Sigma T7024)'den 10 µL eklenip hava kabarcığı oluşturmamaya özen gösterilerek iyice karıştırıldı ve bu karışım kasetin 4/5'ini dolduracak şekilde enjektör yardımıyla iki cam arasına boşaltıldı. Polimerizasyon sırasında jelin üst yüzeyinde düzgün bir hat oluşması ve yüzeyin oksijen ile temasını engellemek için, yüzeyi örtecek şekilde suyla doyurulmuş bütanol enjekte edildi. Jelin polimerizasyonu için yaklaşık 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu bekleme süresinde, total akrilamid oranı % 4.5 olan yükleme jelini (üst jel) hazırlamak üzere 625 µL TrisHCl (1 M, pH6.8), 3.59 mL distile su (dH₂O), 5 µL SDS (% 10 w/v) ve 750 µL Akrilamid/Bisakrilamid (29:1 v/v) iyice karıştırılıp oksijeni uzaklaştırmak için vakumda 15 dakika bekletildi. Ardından karışıma %10 (v/v) APS ve 10 µL TEMED ilave edilip köpük oluşturmada dikkatlice karıştırıldı. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra üst kısımda bulunan suyla doyurulmuş bütanol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı ve yüzey birkaç kez dH₂O ile yıkandı. Daha sonra yükleme jeli, jel kasetinin tamamını doldurana kadar ayırma jelinin üzerine döküldü. Yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirildikten sonra polimerize olması için yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Jel polimerize olduktan sonra, tarak çıkarılıp kuyucuklar dH₂O ile yıkandı. Jel kaseti elektroforez tankına yerleştirildi. Tank, jel kasetinin üzerini kapatacak şekilde 10x yürütme tamponunun (Çizelge 2.4) 10 kez sulandırılması ile hazırlanmış 1x yürütme tamponu ile dolduruldu ve her kuyucuk pipetaj yapılarak bu tamponla yıkandı ve örnek yüklemeye hazır hale getirildi.

2.2.2.2 Elektroforez

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

Çizelge 2.4 Protein örneklerinin jele yüklenmesi ve yürütme işlemi için gerekli tamponlar

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

2.2.2.3 Jelin Boyanması

Yürütme sonrası jel kasetten çıkartıldı, tabanı düzgün bir kaba alınarak üzerine hazırlanmış olan Coomassie boyasından 40 mL eklenip 1 saat çalkalayıcıda bekletildi. Bu işlemin ardından Coomassie boya uzaklaştırılıp protein bantları haricindeki boyanın uzaklaştırılması için hazırlanan yıkama solüsyonundan 40 mL eklendi ve jelin arka fonu renksizleşinceye kadar bekletildi. Gerekli solüsyonların içerikleri ve hazırlanışları Çizelge 2.5'de verildi.

Çizelge 2.5 Jelin boyanması için gerekli solüsyonların içeriği ve hazırlanışı

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

2.3 Proteinlerin Sıvı Kromatografi Sistemi (PF2D) ile İki Boyutlu Ayırımı

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

Çalışmada kullanılan PF2D sisteminin sağlıklı biçimde çalışabilmesi için gerekli olan hazırlık aşamaları ve cihaza ait tüm işlemler "Beckman Coulter PF2D Operator's Manual"de gösterildiği şekilde yapıldı ve tüm aşamalar aşağıda belirtildi [104].

2.3.1 Cam Malzemelerin Hazırlanması

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

2.3.2 Solüsyonların Hazırlanması

PF2D sistemi, proteinlerin farklı özelliklerini temel alarak ayırım yapan iki modülden oluşmaktadır; I. Boyut ayırım modülü, proteinleri izoelektrik noktalarına (pI) göre ayıran “High Performance Chromatofocusing Fractionation” (HPCF) kolonu taşır. Bu modülde pH gradienti (8.5-4.0) oluşturulmak üzere “Başlangıç Tamponu” (BT, pH 8.5) ve “Elüsyon Tamponu” (ET, pH 4.0), kolonun temizliği için de yüksek iyonik kuvvetli solüsyon (HISS) adı verilen 1 M NaCl solüsyonu ve HPLC'ye uygun su kullanıldı. Proteinlerin 1. boyut ayırımında, sağlıklı bir pH gradientinin oluşturulması son derece önemli olduğundan başlangıç ve elüsyon tamponlarının hazırlanmasına [105] büyük özen gösterildi ve bu tamponlar her bir zaman dilime ait örneklerin ayırımına başlanmadan önce taze olarak hazırlandı. Ayrıca her bir zaman dilimindeki örneklerin (3 biyolojik tekrara ait kontrol ve enfekte örnekler) ayırımında BT ve ET kullanıldı. Tamponlar ve hazırlanışları Çizelge 2.6'da verildi.

Çizelge 2.6 1. boyut ayırım için solüsyonların içeriği ve hazırlanışı

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

Hazırlanan BT ve ET tamponları ile HISS solüsyonu 0.22 µm por çaplı selüloz asetat membran filtreden (Whatman OE 67) geçirilip ışık almaması için alüminyum folyo ile kaplanmış cam şişe içinde +4°C’de muhafaza edildi.

II. Boyut ayırım modülü ise proteinleri hidrofobik özelliklerine göre ayıran Yüksek Performanslı Ters Faz” kolonu (High Performance Revers Phase - HPRP) (Eprogen A61689) içerir. Bu kolonda hidrofobisite gradiyenti oluşturulması için HPLC’ye uygun su ve asetonitril (JT Baker, 9821) kullanıldı ve iyon baskılayıcı olarak TFA (trifluoroasetik asit, JT Baker 9470) ilave edildi. Solüsyonların içerikleri ve hazırlanışları Çizelge 2.7’de verildi.

Çizelge 2.7 2. boyut ayırım için solüsyonların içeriği ve hazırlanışı

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

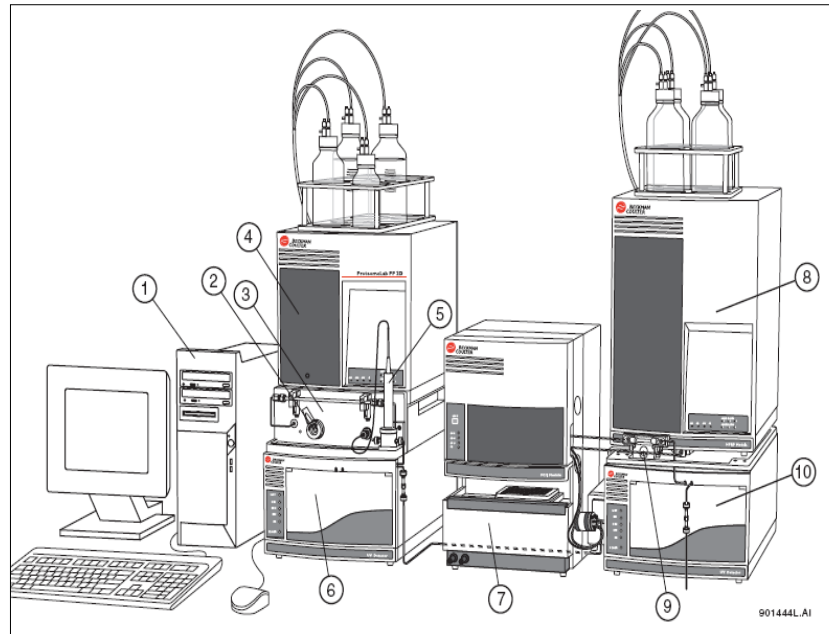
*TFA son derece uçucu ve toksik olduğundan tüm işlemler çeker ocak altında hazırlık gerçekleştirildi.

2.3.3 PF2D Cihazının Hazırlanması

ProteomeLab PF2D sistemi ve sistemi oluşturan kısımlar Şekil 2.4’de gösterildi. Örnek sisteme yüklenmeden önce cihazın hazırlığı için bir takım işlemler gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle başlangıç ve elüsyon tamponlarının oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı. Bu arada sisteme bağlı tüm modüller ve bilgisayar açılarak 32 Karat S/W programı çalıştırıldı. Sistem üzerindeki pH modülüne yerleştirilen pH probu, pH standartları (4.0; 7.0 ve 10.01) ile kalibre edildi. Oda sıcaklığına getirilen BT ve ET’lerinin pH’ları bu prob ile kontrol edildi. BT için pH değerinin 8.5, ET için ise 4.0’e ayarlandı. Sistemde kullanılacak tüm tampon ve solüsyonlar (BT, ET, HISS, HPLC’ye uygun su, TFA içeren su ve asetonitril) hazırlandıktan sonra ultrasonik su banyosunda 5 dakika tutularak hava kabarcıklarından arındırıldı ve cihazda uygun yerlerine yerleştirildi ve sisteme akış sağlayacak hatlar sıvıların içine yerleştirildi. Tüm hatların açık olduğu ve sıvı akışının rahat biçimde sağlandığı, atık kanalının açık ve işler durumda olduğu kontrol edildi. Sistemden 0.2 mL / 0.5 dakika akış hızı ile su geçişi başlatıldı. Sistem ve pompa basıncı kontrol edildi. Daha sonra HPCF sisteme yerleştirildi

ve tekrar sıvı akışı ile basınç kontrol edildi. Tüm sistem elemanlarının çalışmaya hazır olduğu belirlendikten sonra 1 saat boyunca kolondan su geçirildi. Bu sırada 2. boyut modülü için gerekli olan %0.1 (v/v) TFA-su ve %0.08 (v/v) TFA-asetonitril solüsyonları modül üzerinde bulunan yerlerine yerleştirildi ve sisteme akış sağlayacak hatlar yerlerine yerleştirildi. 1. boyut modülünde olduğu gibi hatlardan sıvı akışı, pompa basınçları ve atık kanalın açık olduğu kontrol edildi. İkinci boyut kolonu (HPRP) sisteme monte edildi ve kolon içi sıvı geçişi kontrol edildi. Sonrasında HPRP kolonu 50°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blok içine yerleştirildi. Ardından kolondan 1 saat süreyle 0.75 mL / 0.5 dakika akış hızında TFA-su geçişi sağlandı.

Sistemin her iki kolonundan da 1 saat su geçirildikten sonra, her iki modüldeki UV detektörlerin kalibrasyonu yapıldı. Birinci boyut UV 280 nm dalga boyunda, ikinci boyut UV lambası da 214 nm dalga boyunda kalibre edildi. Tüm bu hazırlıklar tamamlandıktan sonra HPCF kolonunun dengelenmesi ve kolon içi pH değerinin 8.5'a çıkarılması için 1. boyut modülünden BT geçirilmeye başlandı. Kolon iç pH'sı 8.5'a ulaştıktan sonra (210 dk) ikinci boyut kolonun dengelenmesi için 5 dakika boyunca %0.08 (v/v) TFA içeren asetonitril ve ardından 5 dakika boyunca %0.1 (v/v) TFA içeren HPLC'ye uygun su geçirildi.



Şekil 2.4 PF2D sistemi ve bileşenlerinin şematik gösterimi

1- Bilgisayar, 2- Manuel enjeksiyon vanası 3- Sistem organizator 4- I. Boyut modülü 5- pH probu, 6- UV-1 dedektörü 7- FC/I (Fraksiyon toplayıcı/Enjeksiyon) modülü, 8- II. Boyut modülü 9- Kolon ısıtıcısı 10- UV-2 Dedektörü

2.3.4 Protein Örneklerinin Hazırlanması

PF2D cihazına yüklenecek olan örneklerin tuzlardan arındırılarak BT içerisine alınması gerekmektedir. Bunun için -86°C'de muhafaza edilen total protein örnekleri oda sıcaklığına getirildikten sonra PD-10 (GE Healthcare, W396289) kolondan geçirildi. Öncelikle PD-10 kolondan 25 mL BT geçirilerek proteinlerin tutunması için kolon dengelendi. Oda sıcaklığına getirilen örneklerin hacmi BT ile 2.5 mL'ye tamamlanıp kolona yüklendi. Örnek tamamen kolondan geçtikten sonra 3.5 mL BT kolona eklenerek bir iki damla atıldıktan sonra kalan kısım temiz bir tüpe toplandı. Daha sonra toplanan örneğin protein konsantrasyonu Bölüm 2.2.2'de belirtilen Bradford yöntemiyle tayin edildi.

2.3.5 Örneklerin PF2D Sistemine Yüklmesi

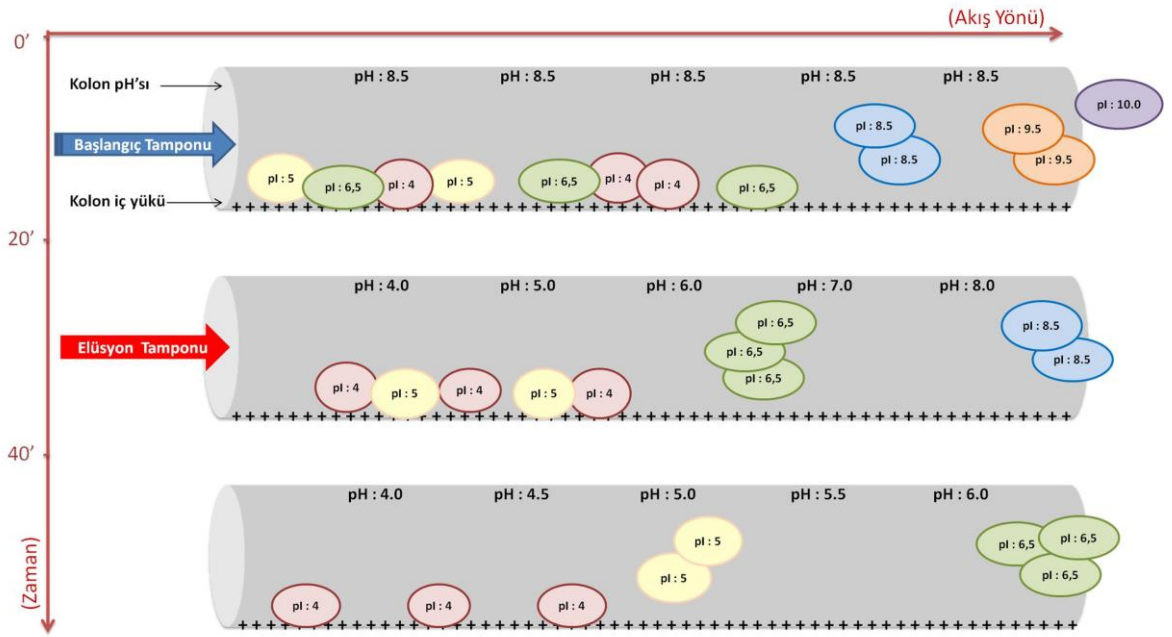
Örnekler cihaza yüklenmeden önce cihazın fraksiyon toplayıcı (FC/I) modülüne 1 adet 2 mL'lik 96 kuyulu özel mikroplaka (Greiner 780270) yerleştirilip soğutucu çalıştırıldı (+10°C). Aynı şekilde 2. boyut modülünde bulunan fraksiyon toplayıcıya da 2 mL'lik 96 kuyulu özel mikroplaklar (Greiner Bio-one 780270) yerleştirilip hazırlandı.

PD-10 kolondan geçirilerek tuzlarından arındırılan protein örneklerinin, başlangıç tamponu içerisinde 3 mg'ı PF2D sistemine yüklendi. Bu işlem için öncelikle cihazın enjeksiyon girişi ve enjeksiyon iğnesi HPLC'ye uygun su ile yıkandı ve 2 boyutlu ayırımın gerçekleştirilmesinde izlenecek adımları içeren metod seçildi. Ardından örnek sisteme enjekte edildi. Her biyolojik tekrar için karşılaştırılması yapılacak kontrol ve enfekte örneklerden eşit miktarda örnek yüklenmesine özen gösterildi.

2.3.5.1 I. Boyut Ayırım

Birinci boyutta izoelektrik noktasına göre ayırımın sağlanabilmesi için kolon içinde 8.5 'dan başlayarak 4.0'a doğru ilerleyen pH gradiyenti oluşturulmaktadır. Bu süreçte kolondan geçen proteinler hareketli faz aracılığı ile kolon içerisinde ilerlemekte ve kendi pI'larının kolon içindeki pH değerine göre yüksek, düşük veya aynı değerde oluşuna göre ayrılmaktadır. Protein örneği, sisteme yüklendikten sonra ilk 20-40 dakika kolon içi pH değeri 8.5'da tutulmakta, bu süreçte pI'sı 8.5'dan büyük olan proteinler

kolondan ayrılarak zamana bağlı olarak fraksiyonlanmaktadır. Daha sonra sistemde yavaş yavaş pH değeri düşürülerek 0.3 pH aralığında fraksiyonlama yapıldı. Gradyent sırasında proteinin pI değeri kolon içi pH'sından yüksek ise kolondan çıkarılmakta, aynı değere sahip ise kolonda asılı kalmakta ve düşükse kolon iç yüzeyinde tutulmaktadır (Şekil 2.5). Kolondan çıkan proteinler UV-1 detektörden geçerek 96 kuyulu mikropalaklarda toplanırlar. Tüm ayırım süresince kolondan çıkan proteinlerin UV-1 detektör tarafından 280 nm'deki absorbans değerlerinin ölçümü ile proteinlerin varlığı ve miktarını gösteren "UV-1 kromatogramı" oluşturulmaktadır.



Şekil 2.5 Birinci boyut kolonda proteinlerin pI noktalarına göre ayırımı

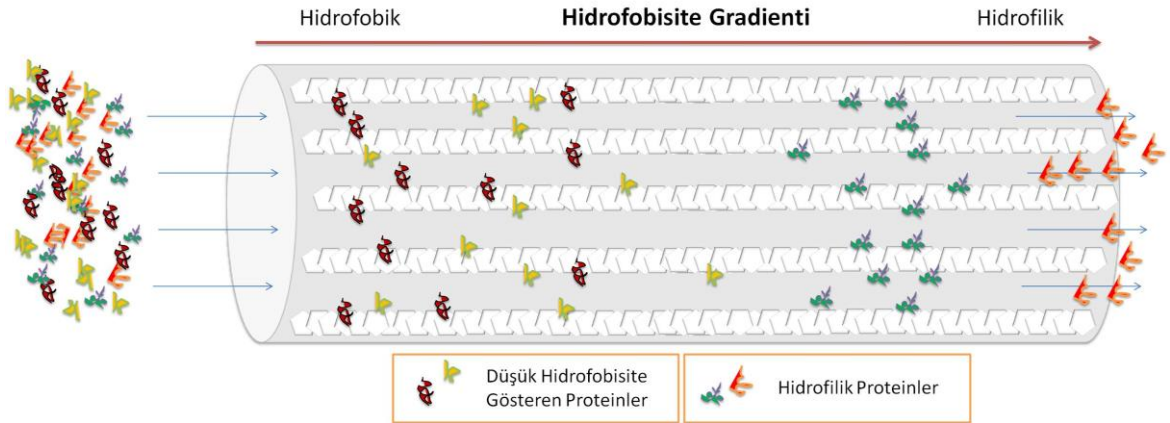
2.3.5.2 II. Boyut Ayırım

Birinci boyutta ayrılarak 96 kuyulu mikropalaklarda fraksiyonlanan protein karışımlarından, her bir fraksiyonun 200 μ L'si 2. boyut ayırım için otomatik olarak HPRP modülüne transfer edildi. Kolon sıcaklığı 50°C'ye ayarlandı.

Her bir kuyucukta fraksiyonlanan protein karışımındaki proteinler, hidrofobisite özellikleri temel alınarak HPRP kolonunda H_2O ve asetonitril ile oluşturulan hidrofobisite gradyenti sayesinde ayrılmaktadır (Şekil 2.6). Bunun için, başlangıçta kolondan %100 H_2O geçişi ile hidrofilik proteinlerin ayırımı gerçekleştirilmekte, ardından asetonitril geçişi ile kolon içinde %100 asetonitrile doğru bir gradient akışı

sağlanmaktadır. Böylece kolon içinde polardan apolara doğru bir ortam sağlanmakta ve hidrofobisitesi en düşük olan proteinlerden başlanarak gradiyent boyunca hidrofobisitesi artan proteinlerin ayırımı gerçekleştirilmektedir. Kolondan ayrılan proteinler zamana bağlı olarak (0.75 mL/0.5 dakika) 2. boyut fraksiyon toplayıcıda 96 kuyulu mikrotiplalara fraksiyonlanmaktadır. Son olarak da %100 asetonitril geçişiyle hidrofobisitesi en yüksek olan proteinlerin ayırımı yapılmakta ve 2. boyut ayırımı tamamlanmaktadır.

Bu modülde bulunan UV-2 detektör, proteinlerin peptit bağlarının 214 nm dalga boyundaki absorbansını ölçerek daha hassas bir protein tespiti sağlamaktadır. Böylece elde edilen UV piklerinin her biri tek bir proteini temsil etmekte ve her fraksiyon için bu piklerden oluşan “UV-2 kromatogramı” oluşturulmaktadır. Bu süreç 1. boyutta ayrılan ve 2. boyuta transfer edilen her fraksiyon için tekrarlanmaktadır [115], [116]. Analizler süresince bilgisayar yazılımı üzerinden örneklerin birinci ve ikinci boyut kromatogramları kontrol edilir.



Şekil 2.6 İkinci boyut kolonda proteinlerin hidrofobisitetlerine göre ayırımı

2.3.6 Kromatogram Verilerinin Analizi

PF2D sisteminde iki boyutlu ayırım sonucunda tamamlandıktan sonra elde edilen veriler sisteme özgü olarak geliştirilen ProteoVue yazılımı tarafından işlenerek sanal jel haritalarına dönüştürüldü. Bunun için bir örneğin 1. boyut ayırımında toplanan fraksiyonların pH aralık değerleri ve bu fraksiyonlardan her birinin 2. boyut ayırımı sırasında elde edilen UV-2 kromatogramları birebir eşleştirildi. Bu şekilde bir örneğe

ait, tüm fraksiyonların protein profili sanal jel haritalarında düzenlenerek iki boyutlu jel görüntüsü biçiminde elde edildi.

Kontrol ve enfekte örneklerin protein profillerinin karşılaştırılmasında ise DeltaVue programı kullanıldı. Bunun için ProteoVue ile hazırlanmış olan 2 örneğe ait sanal jel haritaları eş zamanlı olarak DeltaVue programında kontrol örnek sağda, enfekte örnek solda olacak şekilde yerleştirildi. Her örneğe ait haritada hem kromatogram hem de sanal jel görüntüsü birlikte izlendi. Ortada ise iki profil üst üste çakıştırılarak incelendi. Daha detaylı karşılaştırma yapabilmek için her iki örneğin aynı pH aralığına sahip fraksiyonlarındaki protein bantları birebir karşılaştırıldı ve UV-2 kromatogramlarında yer alan her bir protein piki birebir eşleştirilip numaralandırıldı. Numaralanan her pik için alan hesabı yapılarak ekspresyon miktarı belirlendi. Seçilerek numaralanan her pik için pH aralığı, miktarı, eşleştirildiği proteine oranı gibi detaylı bilgiler elde edildi. Sonuç olarak karşılaştırılan iki ayrı örneğe ait tek tek tüm fraksiyonlar ve her fraksiyondaki tek tek tüm proteinler karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Böylelikle anlatım düzeyi farklı olan protein pikleri kolayca gözlenebildi. Daha sonra da anlatım farkları oranı ≥ 2 olan proteinler kütle spektrometresinde (MS) analiz edilmek üzere seçildi.

2.4 Proteinlerin Tanımlanması

2.4.1 Kütle Spektrometre (MS) Analizleri İçin Örnek Hazırlığı

PF2D sisteminde iki boyutlu ayırımı yapılan ve nanoLC-ESI-MS/MS analizi için seçilen fraksiyonlar 1.5 mL'lik LoBind tüplere alındı ve vakumlu konsantratörde (Eppendorf AG Cocentrator Plus 5305) kurutuldu. Kurutulan protein örnekleri daha sonra 10 μ L 50 mM amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3) içerisinde, tüp karıştırıcıda karıştırılarak çözündürüldü.

Seçilmiş olan proteinleri içeren fraksiyonların MS analizleri için hazırlanmasında iki yol izlendi; i) Tek protein piki içeren fraksiyonlarda doğrudan tripsinizasyon, ii) Birden fazla protein piki içeren fraksiyonlarda III. boyut ayırım ve ardından tripsinizasyon. Kütle spektrometrik analizler için örnek hazırlığı aşaması Şekil 2.7'de özetlenmiştir.

iyodoasetamid (200 mM) eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Bu işlemin ardından örnekler, enzim:protein oranı 1:50 olacak şekilde tripsin eklendi ve 37°C'de gece boyu inkübe edildi.

2.4.1.2 III. Boyut Ayırım Sonrası Tripsinizasyon

Birden fazla protein varlığı gözlenen fraksiyonlarda tek boyutlu SDS-PAGE yapılarak proteinlerin 3. boyut ayrımları sağlandı. Jelde yan yana yüklenen kontrol ve enfekte örneklerin protein bantları karşılaştırılarak farklı anlatım düzeyine sahip olan protein bantları jelden kesilerek MS analizi yapıldı. Bu amaçla tek boyutlu %4-%20 gradiyent SDS-PAGE jeller (Precise™ Protein Gels 25244) kullanıldı. 10 µL 50mM NH₄HCO₃ içinde çözündürülen III. boyut ayırımı yapılacak örnekler 4:1 oranında örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. Karışım vortekslenip proteinlerin denatüre edilmesi için 95°C'de 3 dakika inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra jele yüklendi. Yürütme tamponu olarak 1x Tris-HEPES Tamponu kullanıldı. Örnekler 100 V sabit voltajda yaklaşık 1 saat yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra Oriole™ Floresans Jel Boyama Kiti (Bio-Rad 161-0497) kullanılarak proteinler görüntülendi. Bunun için önce boyama solüsyonu hazırlandı. Bunun için 590 mL Oriole jel boyama solüsyonu üzerine 400 mL metanol ve 10 mL konsantre boya (oriole fluorescent gel stain concentrate) eklendi ve iyice çalkalandı. Daha sonra jel kasetten çıkartılarak bir kaba alındı ve üzerini örtecek şekilde boyama solüsyonu eklendi. Üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak 90 dakika çalkalayıcıda bekletildi.

Floresan olarak boyanmış olan jel UV ışık altında görüntülendi ve bant seçimi için fotoğraf çekildi. Görüntülenen jelde anlatım farkı gözlenen bantlar seçilerek UV ışık altında temiz bir asetat üzerinde ve steril bir neşter kullanılarak kesildi. Kesilen jel parçası küçük parçalara ayrıldı ve ependorf tüpe alınarak, tripsinizasyon yapılana kadar +4°C'de saklandı.

Tripsinizasyon için kullanılan kimyasal ve solüsyonlar ile hazırlanışları Çizelge 2.9'da verildi.

Çizelge 2.9 Jel analizi sonrası tripsinizasyon için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları

Kimyasal/Çözelti Adı	İçeriği	Hazırlanışı
Temizleme çözeltisi	Asetonitril, 100 mM NH_4HCO_3	Bileşenler 1:1 (v/v) oranında karıştırılır.
10 mM DTT	15.4 mg DTT, 50 mM NH_4HCO_3	DTT tartılıp son hacmi 10 mL olacak şekilde 50 mM'lık NH_4HCO_3 içerisinde çözülür.
55 mM İyodoasetamid	102 mg İyodoasetamid, 50 mM NH_4HCO_3	İyodoasetamid tartılıp son hacmi 10 mL olacak şekilde 50 mM'lık NH_4HCO_3 içerisinde çözülür.
100 mM Amonyum bikarbonat	80 mg NH_4HCO_3	Bileşen tartılıp son hacmi 10 mL olacak şekilde HPLC'ye uygun su içerisinde çözülür.
50 mM Amonyum bikarbonat	40 mg NH_4HCO_3	Bileşen tartılıp son hacmi 10 mL olacak şekilde HPLC'ye uygun su içerisinde çözülür.
20 ng / μL tripsin	Tripsin	1 vial tripsin 1 mL 50 mM NH_4HCO_3 içerisinde çözülür.
Ekstraksiyon çözeltisi	30 μL %1 (v/v) formik asit, %2 (v/v) asetonitril	Bileşenler tartıldı ve 1 mL ye HPLC'ye uygun su ile tamamlandı.

Jelden kesilen bantların MS analizler için hazırlanması amacıyla Wilm vd. [106] tarafından geliştirilen prosedür kullanıldı. Kesilmiş ve Eppendorf tüpe aktarılmış olan jel parçaları üzerine 50 μL temizleme çözeltisi ilave edildi ve 30 dakika karıştırıcıda çalkalanarak jeldeki boya uzaklaştırıldı. Daha sonra temizleme çözeltisi pipet ile uzaklaştırılıp jel parçaları üzerine 50 μL asetonitril eklendi. Bu işlem yapıldığında jel parçalarının birbirine yapışıp beyaz renk aldığı görüldü ve asetonitrilin fazlası pipet ile uzaklaştırılıp jel 50°C'de kurutuldu. Jel üzerine 100 μL , 10 mM DTT ilave edilip 60°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 100 μL , 55 mM İyodoasetamid eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. DTT ve İyodoasetamid pipet ile uzaklaştırıldı ve jel parçaları iki defa 500 μL , 50 mM amonyum bikarbonat ile yıkayıp yıkama çözeltileri pipet ile uzaklaştırıldı. Jel parçaları 200 μL asetonitril ile işleme sokuldu. Bu sırada jel parçalarının birbirine yapışarak beyaz renge dönüştüğü gözlemlendi. Asetonitril uzaklaştırıldıktan sonra jel parçaları 200 μL , 50 mM amonyum bikarbonat içinde süspanse edildi. Amonyum bikarbonat uzaklaştırıldı ve asetonitril ve amonyum bikarbonat ile yapılan işlemler 2 kez tekrarlandı. Jel parçaları 200 μL asetonitril ile yıkayıp, asetonitril uzaklaştırıldıktan sonra 50°C'de kısa bir süre kurutuldu ve 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde hazırlanmış 20 ng/ μL konsantrasyonundaki tripsin solüsyonundan 25-30 μL (jel yüzeyini kaplayacak kadar) eklendi ve 16-18 saat 37°C'de inkübe edilerek jelde bulunan proteinlerin triptik peptidlere parçalanması sağlandı.

Daha sonra elde edilen triptik peptidlerin jelden ekstraksiyonu için 30 µL %1 (v/v) formik asit ve %2 (v/v) asetonitril içeren ekstraksiyon çözeltisi eklenip 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi ve aşağıda açıklandığı biçimde temizlendi.

2.4.1.3 Triptik Peptidlerin Temizlenmesi

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

ZipTip ile temizlenen örnekler vakumlu konsantratörde kurutulup 5 µL %0.1 (v/v) formik asit içeren HPLC'ye uygun su içerisinde çözündürüldü. Elde edilen triptik karışıma 1 mL 50 mM amonyum bikarbonat içinde çözündürülmüş internal kalibrant (50 fmol ADH1_YEAST- Waters MassPrep Enolase Digestion Standart, 186002325) çözeltisinden 0.5 µL eklendi ve 3-5 saniye vortekslenip nanoLC-ESI-MS/MS cihazına özel plastik şişelere hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarıldı ve kütle spektrometresine (Waters SNAPT-HDMS) yerleştirildi.

2.4.2 NanoLC-ESI-MS/MS ile MS Analizleri

Tanımlaması yapılacak proteinler hazırlandıktan sonra TÜBİTAK MAM GMBE'de bulunan Waters HDMS nanoLC-ESI-MS/MS (nanoACQUITY ultra basınçlı likid kromatografi (UPLC) ve SYNAPT Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometri) sisteminde kütle spektrometre analizi yapıldı. Bu amaçla 2 µL örnek sisteme "nanolockspray iyon kaynağı" ile yüklendi. Örnek enjeksiyonundan önce kolonlar %97 mobil faz A solüsyonu

(%0.1 formik asit içeren LC-MS su) ve %3 mobil faz B solüsyonu (%0.1 formik asit içeren asetonitril) ile dengelendi ve kolon sıcaklığı 35°C'ye ayarlandı. İlk olarak peptidler nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap kolonda (5 µm tanecik boyutulu, 180 µm x 20 mm boyunda) 5 µL/dakika akış hızında 5 dakika yürütüldü. Peptidler kolondan gradiyent elüsyonuna göre ayrıldı ve analitik kolonda (nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column, 1,7 µm tanecik boyutlu, 75 µm x 250 mm boyunda) 300 nL/dakika akış hızında %5'den %40'a kadar artan lineer bir asetonitril gradiyenti boyunca 90 dakika yürütüldü.

Belirli bir m/z değerindeki bütün peptidlerin parçalanarak tanımlanması için cihaz pozitif iyon V modunda ("Data independent acquisition" Veri bağımsız yakalama modunu sağlamak için) çalıştırıldı. MS ve MS/MS fonksiyonları 1.5 saniye aralıklarla 6 V düşük enerji ve 15-40 V yüksek enerji çarpıştırmaya dayanarak peptid kütle/yük oranı (m/z) ve amino asit sırasını belirlemek için ürün iyon bilgisi kayıt altına alındı. Elde edilen kütle bilgisinin doğruluğunu kontrol amacıyla kalibrant Glu-fibrinopeptid 45 saniyede bir nanolockspray iyon kaynağından 300 nL/dakika akış hızında geçirildi. Bütün bu ayarlar uygulanarak 50-1600 m/z değerleri arasında peptid sinyali alınan veriler kayıt edildi.

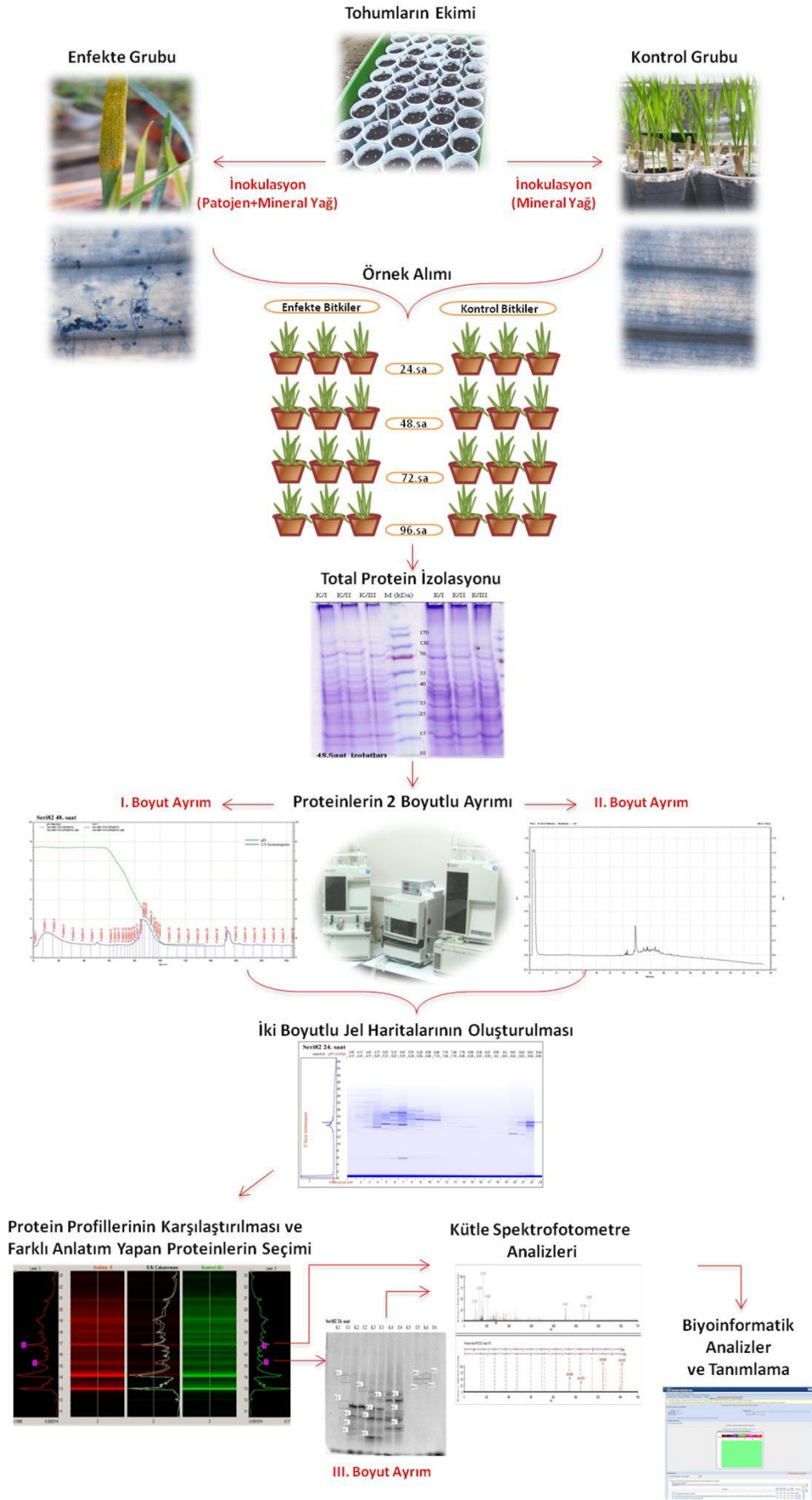
2.4.3 Verilerin Biyoinformatik Analizi

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

BÖLÜM 3

SONUÇLAR

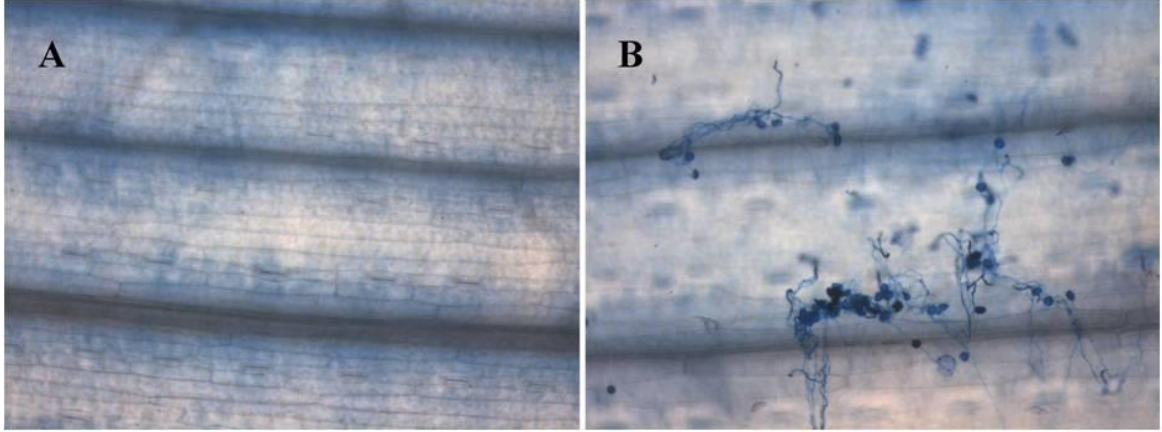
Çalışma kapsamında sarı pas hastalığına karşı hassas Seri82 çeşidinde hastalık gelişimi sırasında ekspresyonu değişen proteinlerin belirlenmesi amacıyla, patojenle inokule edilmiş (enfekte) ve boş inokulasyon yapılmış (kontrol) bitki gruplarından 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde örnekler alınmış ve total protein izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrasında kontrol ve enfekte örneklerin proteinleri PF2D sisteminde 2 boyutlu ayrılmış ve fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonlanan kontrol-enfekte örnekleri bire bir karşılaştırılarak, kontrole göre enfekte örneklerde farklı anlatım yapan proteinlere özgü protein profilleri oluşturulmuş ve anlatım farklılığı belirlenmiş proteinlerin MS analizleri nanoLC-ESI-MS/MS sistemi ile yapılmıştır. Analizler sonucu her bir örneğe ait elde edilen MS verileri ve bu verilerin işlenmesi ile elde edilen amino asit dizileri Uniprot buğday ve Broad Institute Puccinia veritabanlarında taranarak proteinler tanımlanmıştır. Çalışmada gerçekleştirilen işlemlerin akış özeti aşamaları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Tez çalışmasındaki iş akışının şematik gösterimi

3.1 İnokulasyon Cevabının Mikroskopik ve Makroskopik Gösterimi

İnokulasyonun 5. gününde Trypan Blue boyama yöntemi ile görüntülenen inokulasyon cevabı Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Enfeksiyon cevabının mikroskopik olarak görüntülenmesi

(A. Boş inokulasyon yapılan örnek/Kontrol, B. Pst inokulasyonu yapılan örnek/Enfekte)

İnokulasyon cevabının makroskopik gözlenmesinde kullanılan Mc Neal [100] skalasına göre, skalada 0-6 arasında değer alan bitkiler dayanıklı, 7-9 arasındakiler ise hassas olarak kabul edilmektedir. inokulasyonun 16. gününde kontrol ve enfekte bitkilerde yaprak yüzeyinde gözlenen belirtiler Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Bundan 2-3 gün sonra da ikinci değerlendirme yapılarak her bitki için enfeksiyon cevabı skorlandı.

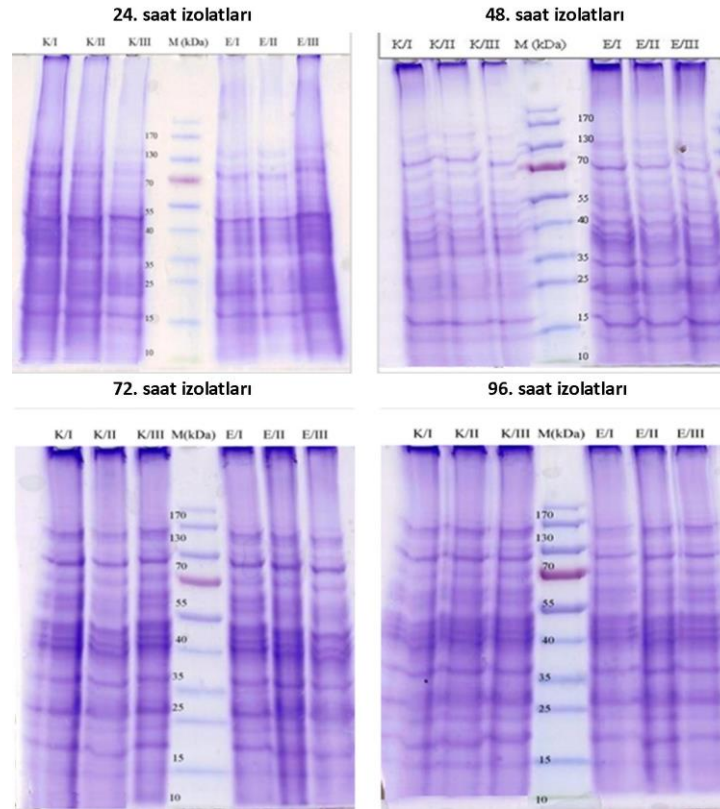


Şekil 3.3 Seri82 çeşidine ait kontrol ve enfekte yaprak örneklerinin makroskopik görüntüsü

3.2 Protein İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini

Total protein izolasyonu patojenle inoküle enfekte grubu bitkilerden ve boş inokülasyon yapılmış kontrol bitkilerinden inokülasyonu takiben 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan yaprak örneklerinden total protein izolasyonları yapılmıştır. -86°C'de saklanmış olan her biyolojik tekrara ait kontrol/enfekte grubu yaprak örneklerinden 3 g izolasyonda kullanıldı. Enfekte grup için enfeksiyon cevabı Mc Neal [100] skalasına göre en yüksek şiddette (8-9) gerçekleşen bitkilere ait yaprak örnekleri kullanıldı ve kontrol/enfekte örneklerden Mg/NP40 yöntemiyle [101] total protein izolasyonu yapıldı. Bir zaman dilimine ait tüm biyolojik tekrarların enfekte ve kontrol örneklerinden protein izolasyon çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü.

İzolasyon sonucunda elde edilen izolatlardaki protein konsantrasyonu Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde Bradford yöntemiyle belirlendi ve analizler sonucunda örneklerden 2.5-3.1 mg/mL aralığında olacak şekilde total proteinler izole edildi. Protein kalitesi ve biyolojik tekrarlar arasındaki uyumu Bölüm 2.2.3'de anlatıldığı şekilde SDS-PAGE analizleri ile kontrol edildi. Yapılan analizler sonucunda enfekte ve kontrol örneklerinin, kendi zaman dilimine ait biyolojik tekrarları arasında miktar ve kalite bakımından benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.4).



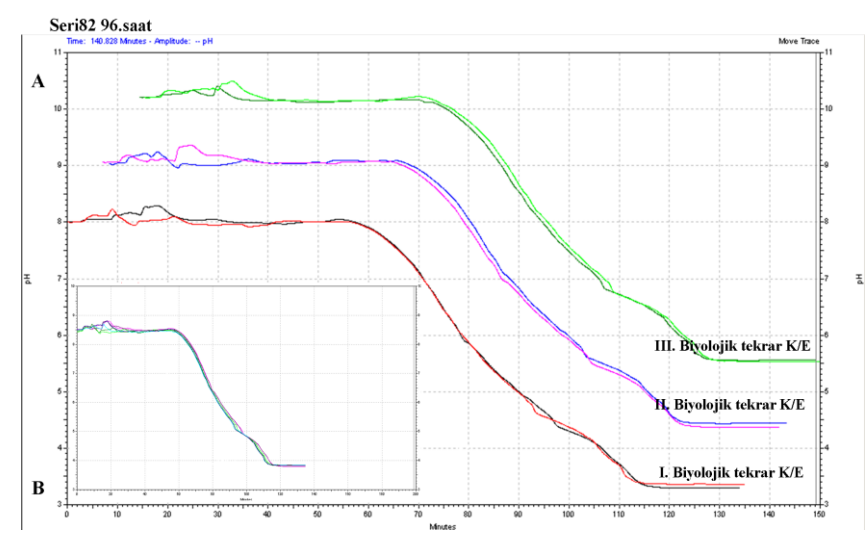
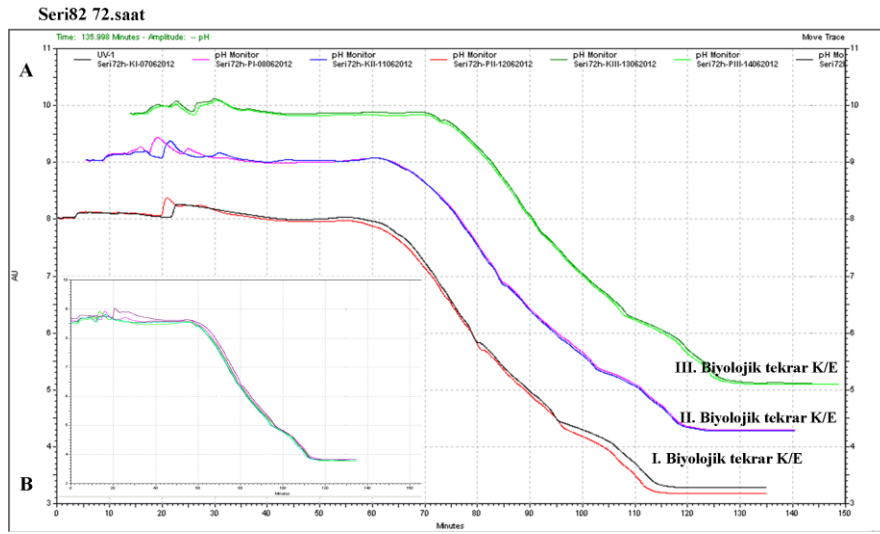
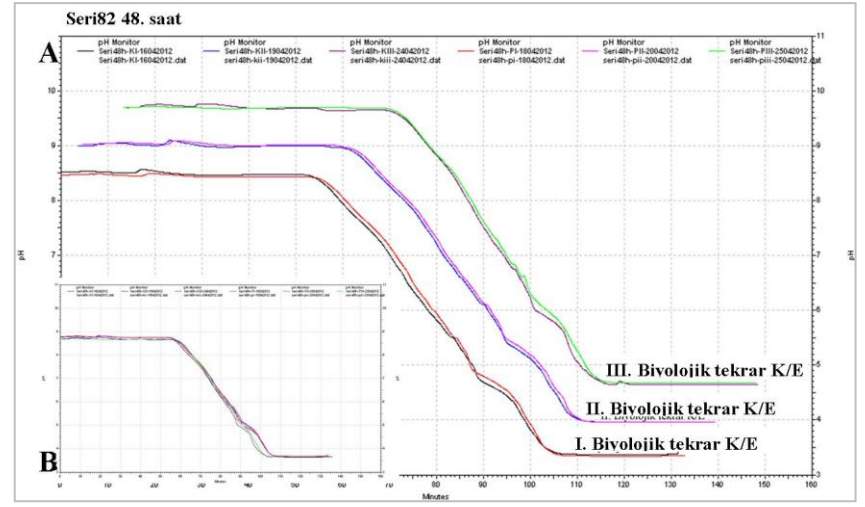
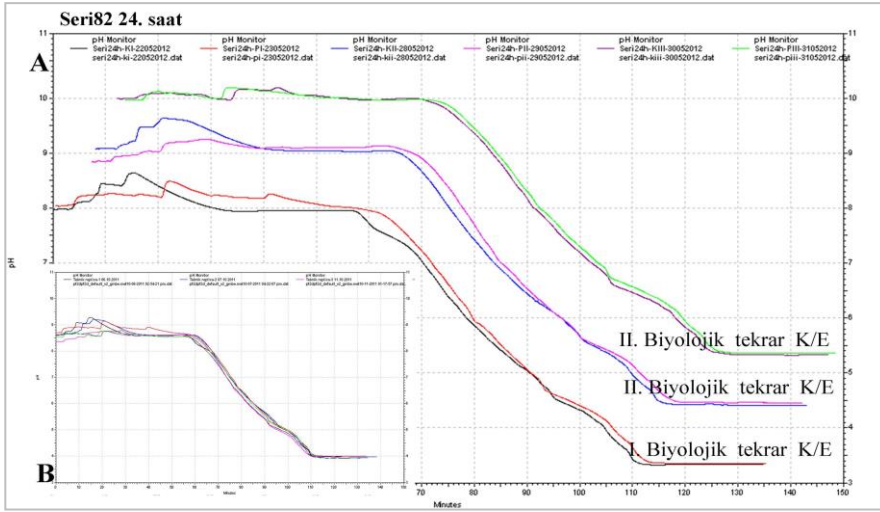
Şekil 3.4 Tüm zaman dilimlerinde üç biyolojik tekrarda, kontrol ve enfekte örneklerin total proteinlerinin SDS-PAGE analiz sonuçları

(M: Protein belirteci (Fermentas #SM0671) K/I: Kontrol / 1. Biyolojik tekrar K/II: Kontrol / 2. Biyolojik tekrar K/III: Kontrol / 3. Biyolojik tekrar E/I: Enfekte / 1. Biyolojik tekrar E/II: Enfekte / 2. Biyolojik tekrar E/III: Enfekte / 3. Biyolojik tekrar)

3.3 PF2D ile Proteinlerin 2 Boyutlu Ayırımı

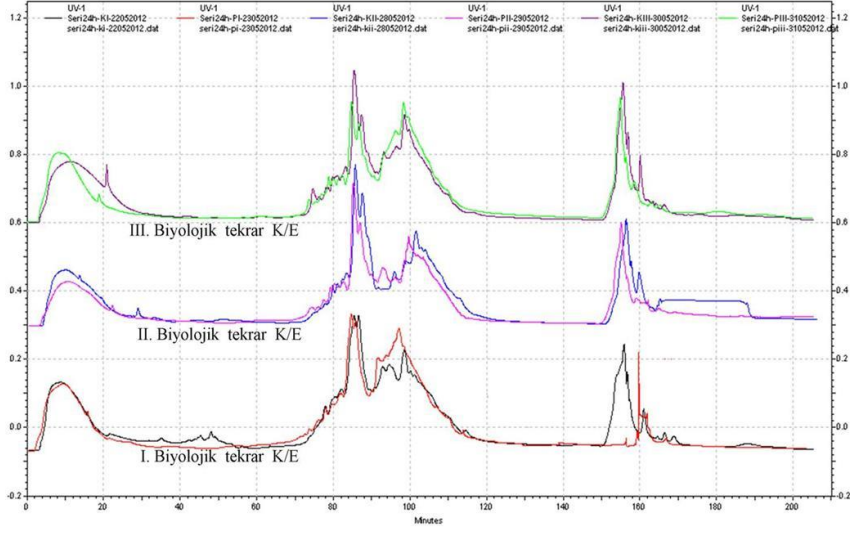
Enfekte ve kontrol örneklerden izole edilen protein örneklerinin PF2D siteminde iki boyutlu ayırımı yapıldı. Her 3 biyolojik tekrarda da hem kontrol hem enfekte örneklerde pH gradiyenti yaklaşık aynı dakikada başladı (60-65 dk) ve aynı hızla devam ederek yaklaşık olarak aynı sürede (110-115 dk) tamamlandı. Kontrol/enfekte örneklerin 1. boyut ayırımlarında oluşturulan pH gradiyentleri Şekil 3.5’de, 1. boyut UV-1 kromatogramlarının üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen değerlendirme grafiği ise Şekil 3.6’da verildi.

Şekil 3.5 Kontrol/enfekte örneklerin 1. boyut ayrımlarında oluşturulan pH gradientleri

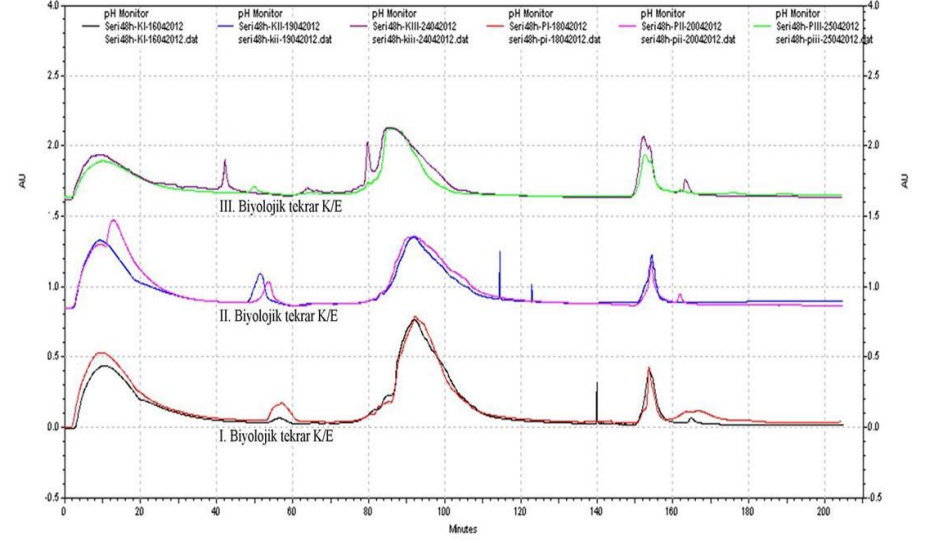


Şekil 3.6 Kontrol/Enfekte örneklerinin 1. Boyut ayırımlarından elde edilen UV1 kromatogramları

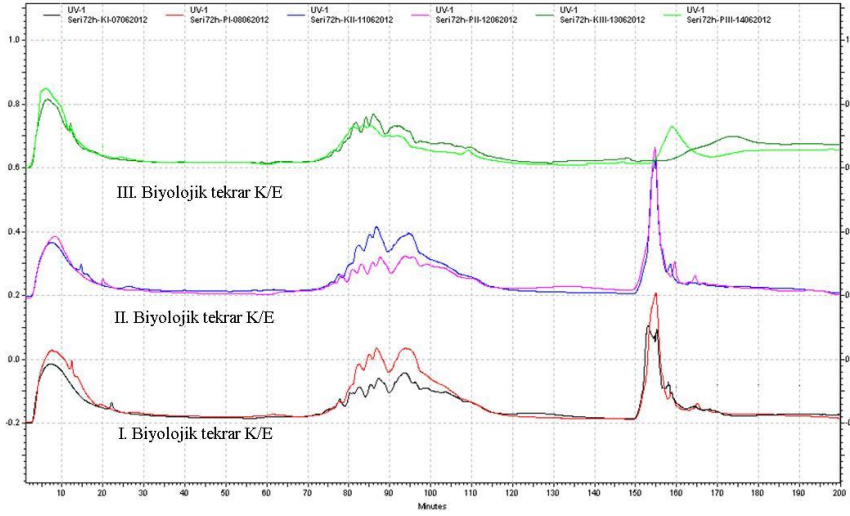
Seri82 24. saat



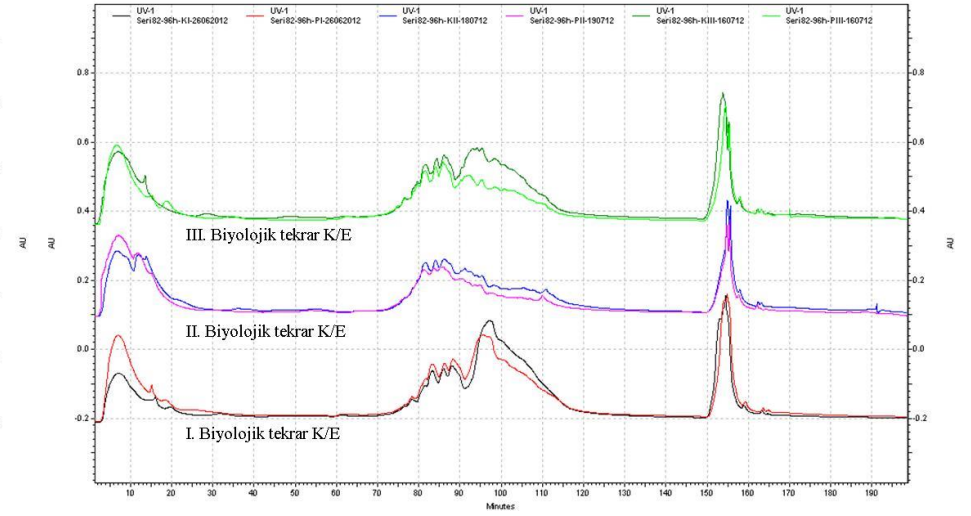
Seri82 48. saat



Seri82 72. saat

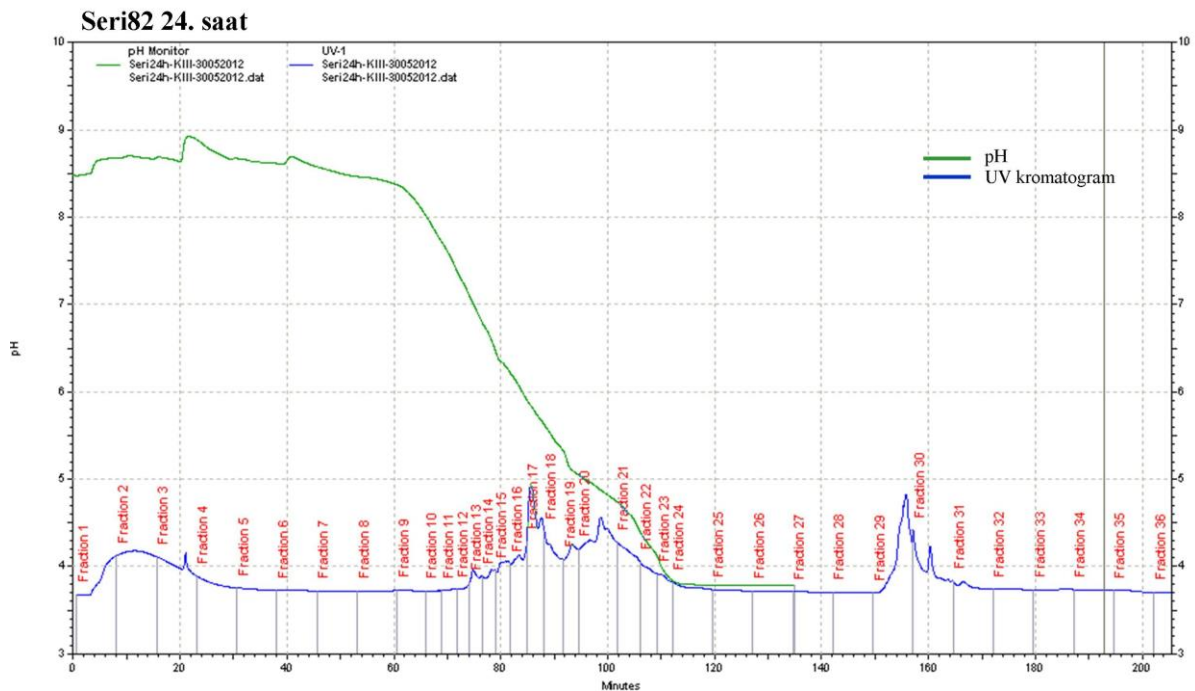


Seri82 96. saat



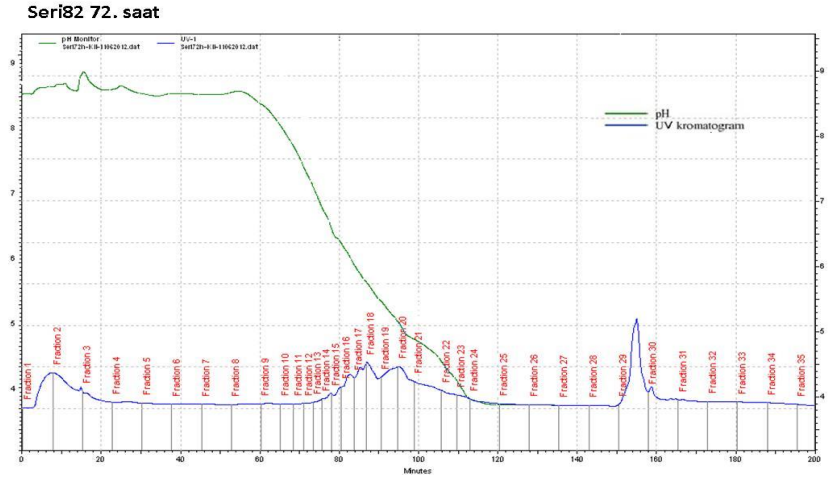
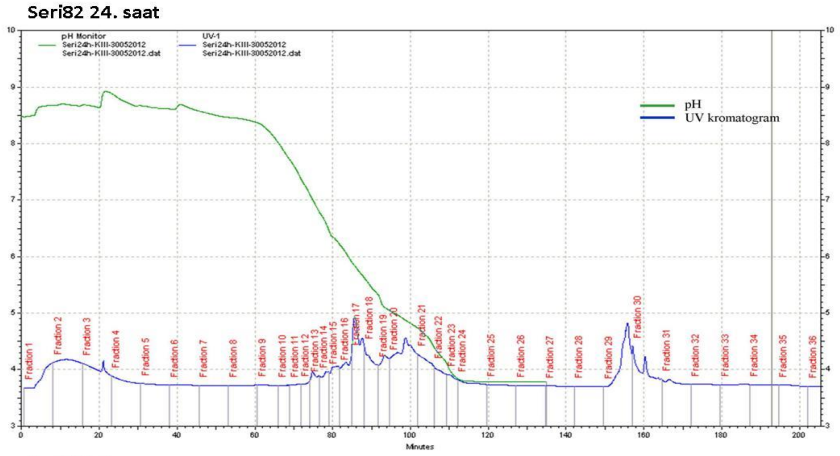
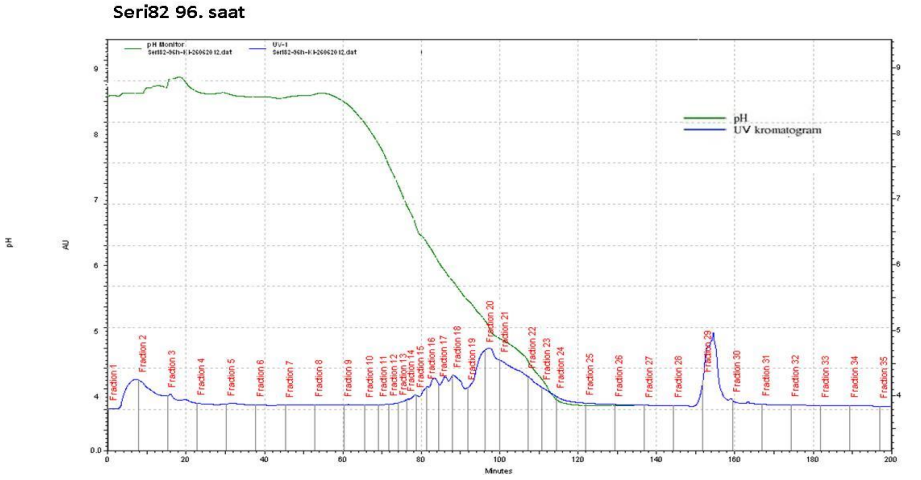
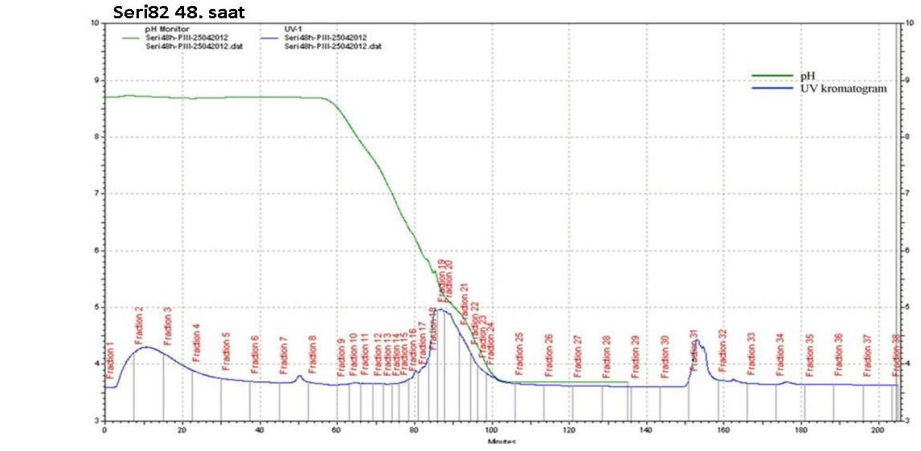
PF2D siteminden elde edilen pH gradienti ve UV-1 kromatogramların hem kontrol/enfekte örnekler arasında hem de biyolojik tekrarlar arasında yüksek oranda benzer olduğu ve 1. boyut ayırımının tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

Tüm örneklerde 1. boyut ayırım sırasında 35 fraksiyon toplandı. pH gradiyenti ve 1. boyut UV kromatogram (UV-1) verileri birleştirilerek her fraksiyonun pH aralığı ve en son protein pikinin görüldüğü genel fraksiyon belirlendi. Tüm örneklerde protein varlığının ağırlıklı olarak ilk 30 dakikada pH 8.5 civarında ve daha sonra 75-110 dakikalar arasında pH 7.0-4.0 arasında toplandığı görüldü. 28-30. fraksiyonlarda ise yüksek yoğunluklu tuz çözeltisinden gelen tuz pikleri gözlemlendi (Şekil 3.7). Bu veriler değerlendirilerek 24. saat ve 48. saat örneklerinde 23, 72. saat ve 96. saat örneklerinde ise ilk 24 fraksiyonun 2. boyut ayırımı gerçekleştirildi (Şekil 3.8). PF2D siteminde yapılan 2. Boyut ayırımın kontrol/enfekte örnekler arasındaki uyum ve farklılıkları, elde edilen 2. boyut UV (UV-2) kromatogramlarının üst üste çakıştırılmasıyla genel olarak değerlendirildi (Şekil 3.9).

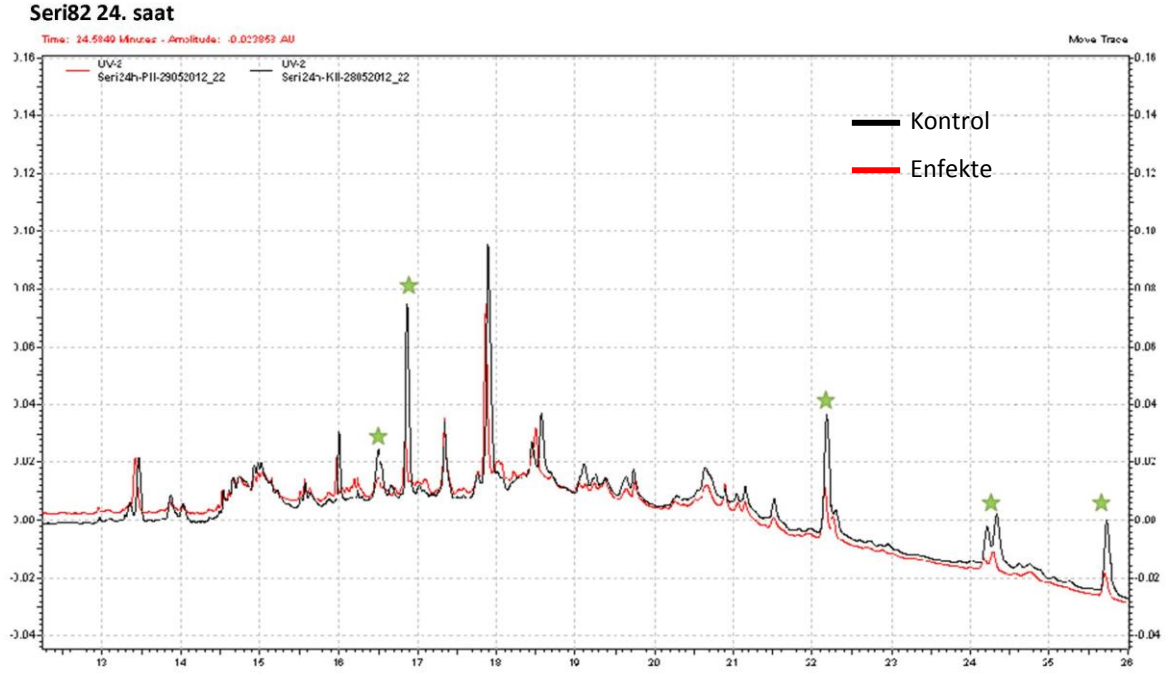


Şekil 3.7 pH ve UV-1 kromatogramlarının çakıştırılması sonucu ikinci boyut ayırımı yapılacak fraksiyonların belirlenmesi

(İlk 24 fraksiyon protein piklerini içerirken, 29-31. Fraksiyondaki pikler HISS'e ait tuz piklerini içermektedir)



Şekil 3.8 Tüm zaman dilimlerine ait birer örnekte 1. Boyut- pH ve UV-1 kromatogram grafikleri (24 ve 48. saat örneklerinde ilk 23 fraksiyon, 72 ve 96. saat örneklerinde ise ilk 24 fraksiyonun 2. boyut ayrımı gerçekleştirildi)



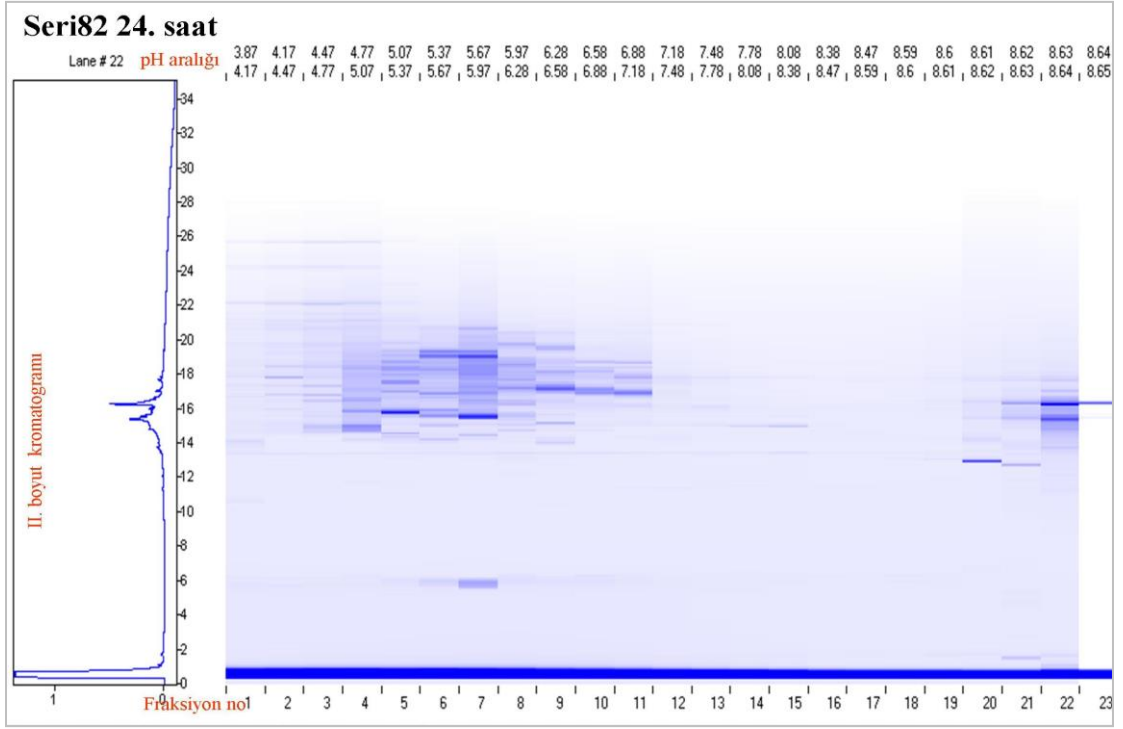
Şekil 3.9 Kontrol ve enfekte örneklerde 2. Boyut ayırma ait UV-2 kromatogramlarının
çakıştırılarak değerlendirilmesi

(★ : kontrole göre enfekte örneklerde ekspresyonu azalan proteinleri göstermektedir)

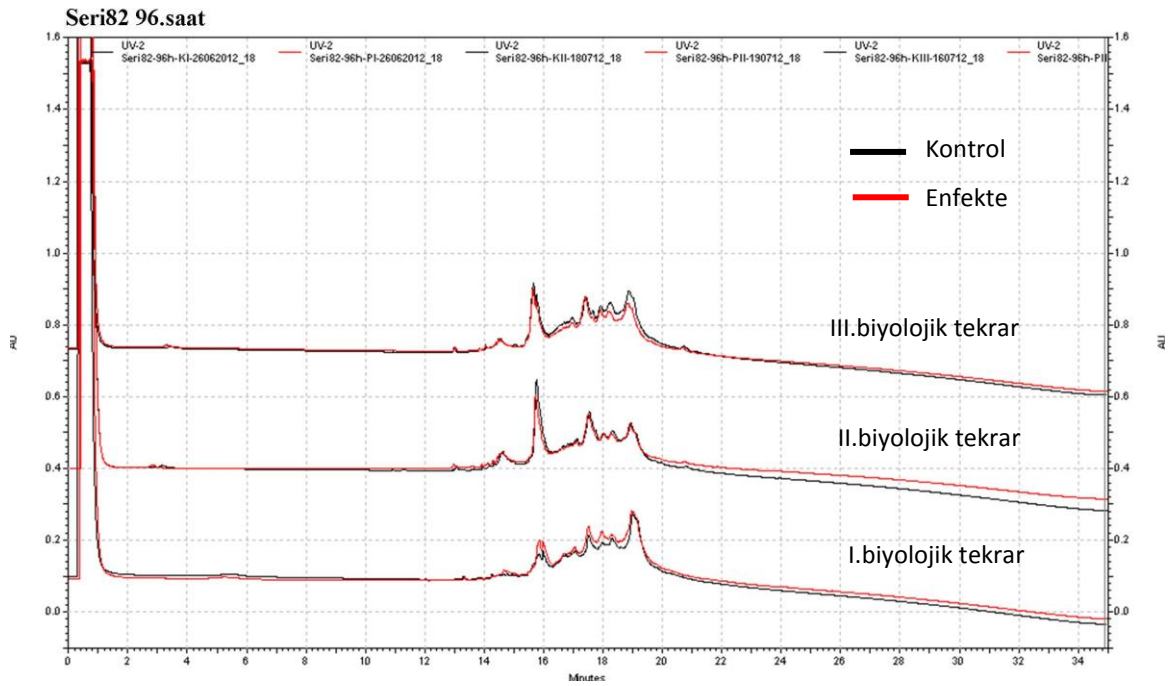
3.3.1 İki Boyutlu Sanal Jel Haritalarının Oluşturulması

Birinci ve ikinci boyut ayırımları tamamlandıktan sonra her bir örnek için sanal jel haritaları ProteoVue yazılımı yardımıyla hazırlandı. ProteoVue yazılımında her örneğin 1. boyut ayırımında toplanan fraksiyonların pH aralık değerleri ile bu fraksiyonlardan her birinin 2. boyut ayırımı sırasında elde edilen UV kromatogramları (UV-2) birebir eşleştirildi. Bu şekilde bir örneğe ait tüm protein içeriği pH aralıkları temel alınarak 2 boyutlu sanal jel haritalarında protein profillerine dönüştürüldü (Şekil 3.10a). Ayrıca örnekler arasındaki yüksek tekrarlanabilirlik Şekil 3.10b’de gösterildi. Yapılan 2 boyutlu ayırımının, tüm zaman dilimlerinde biyolojik tekrarlar arasındaki uyumu Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14’de sunuldu.

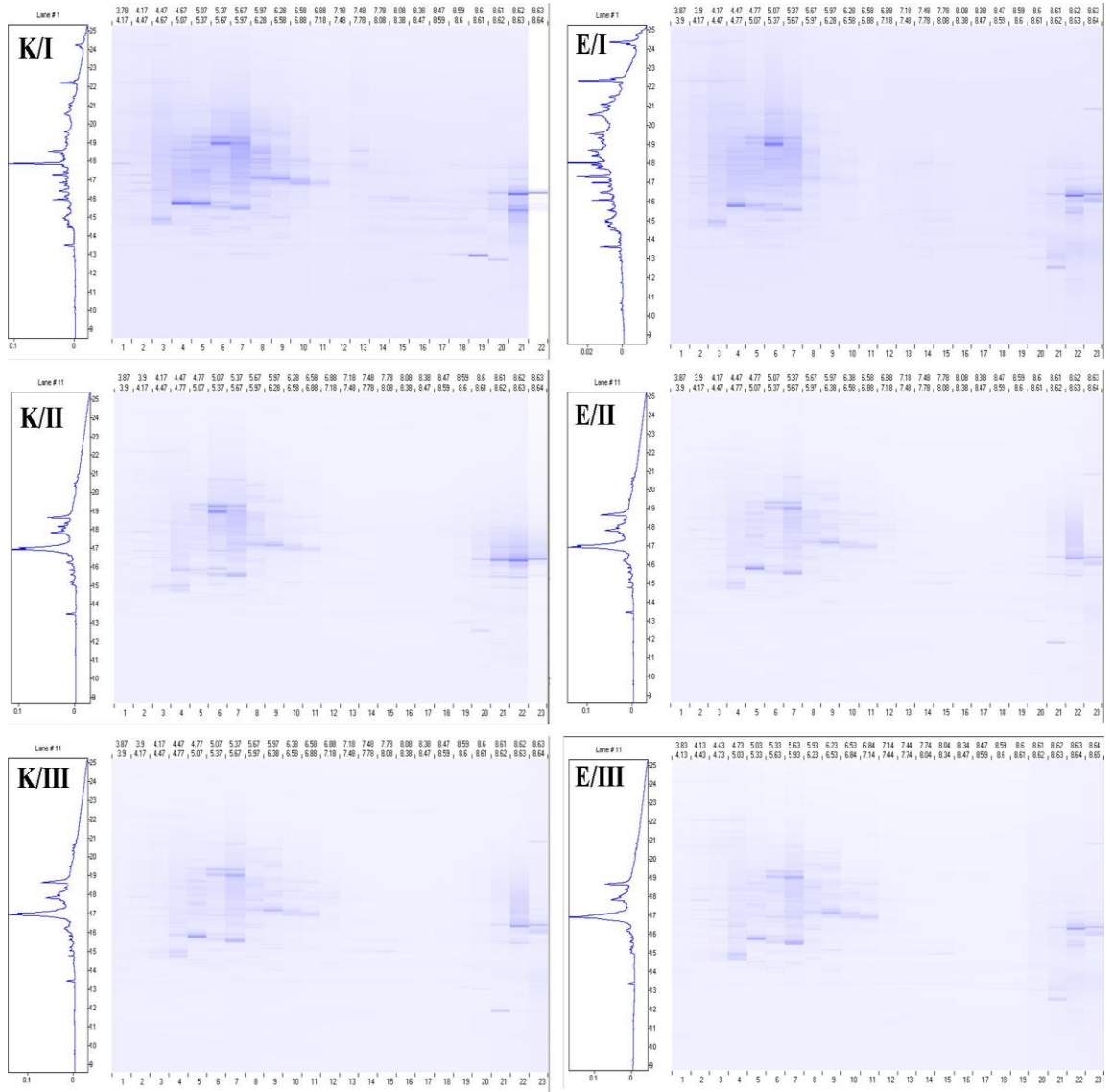
a)



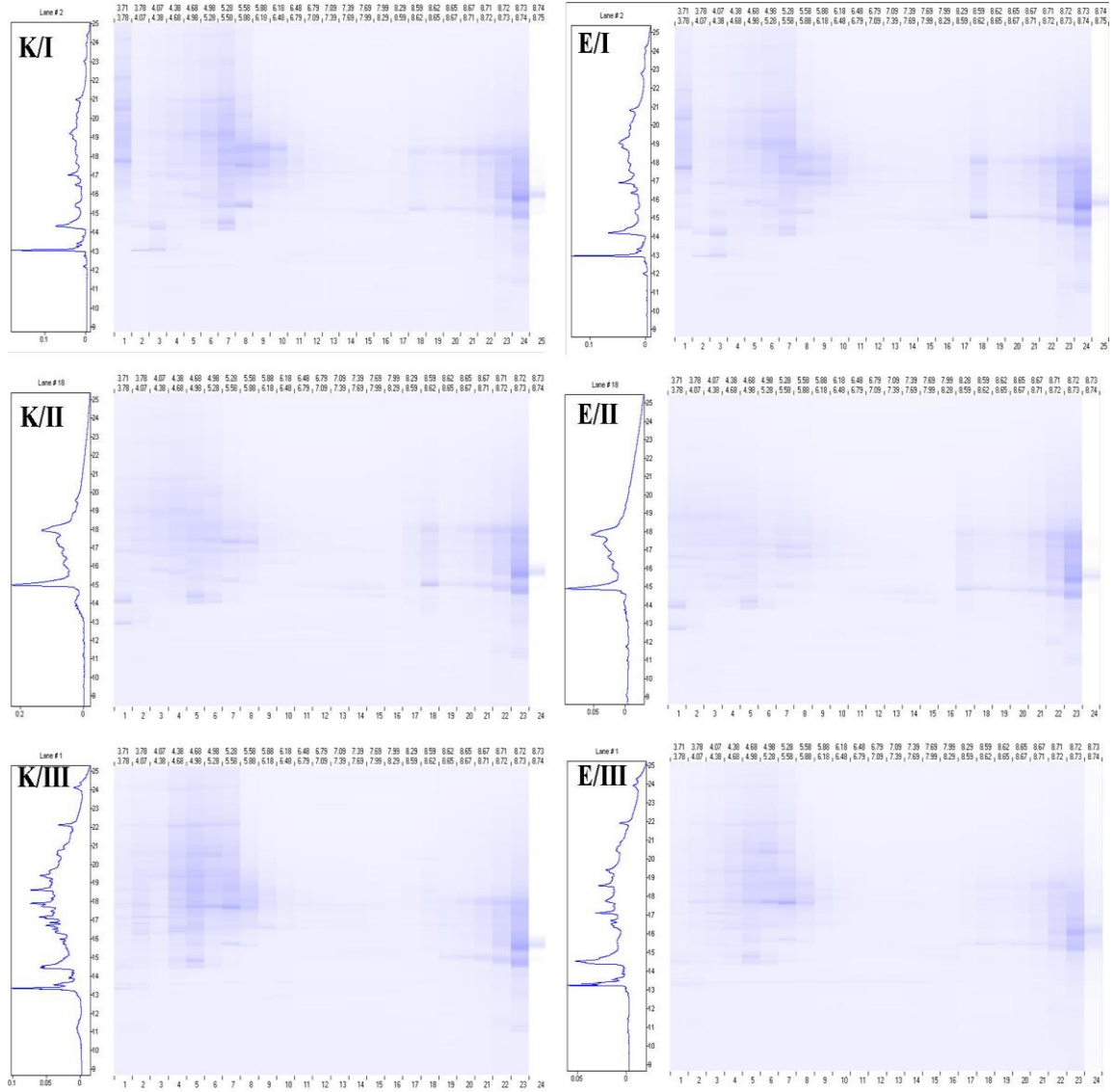
b)



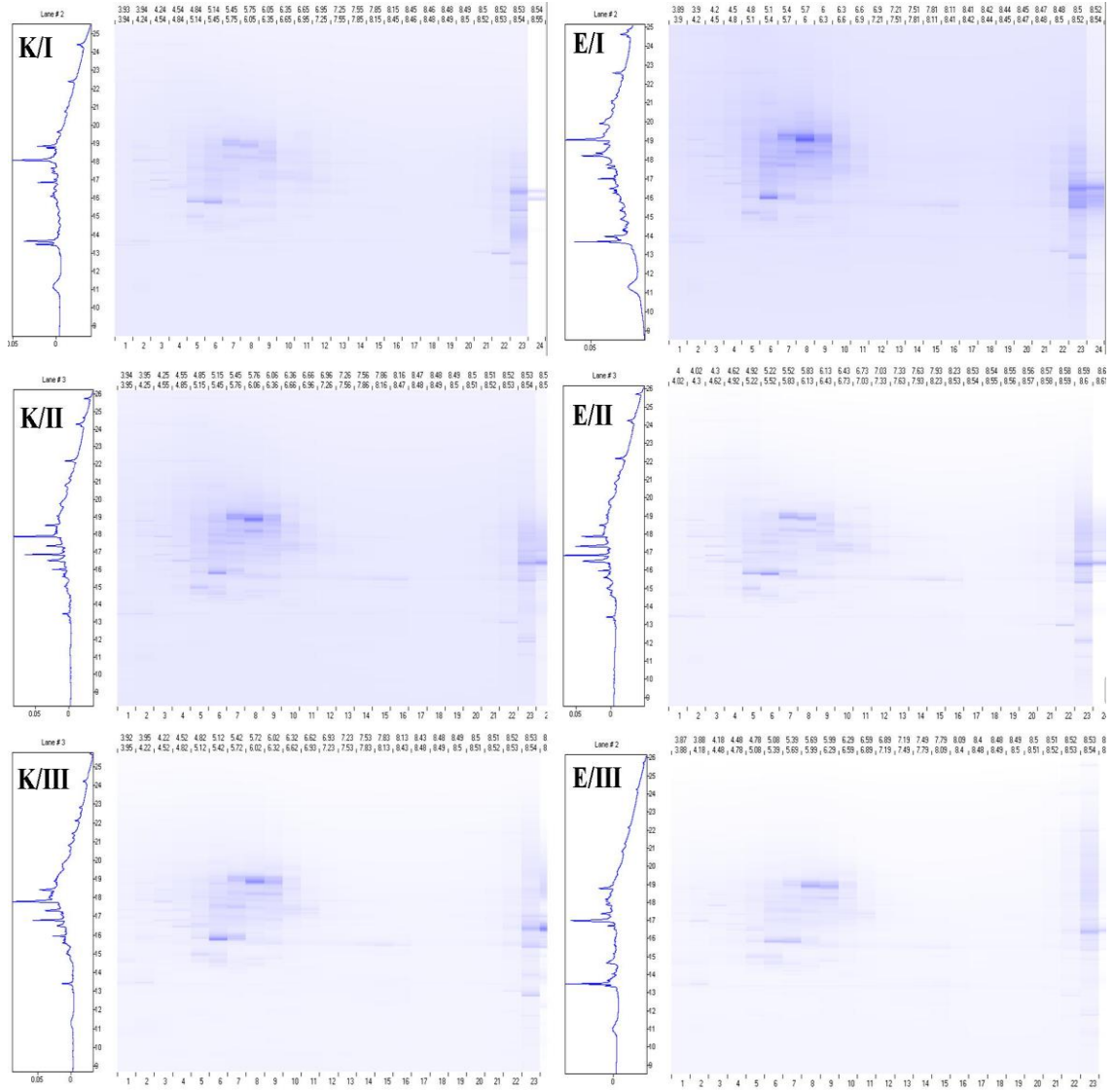
Şekil 3.10 a) Birinci ve ikinci boyut verileri kullanılarak oluşturulan iki boyutlu sanal jel haritası b) UV-2 kromatogramlarının 3 biyolojik tekrarda ve kontrol/enfekte örneklerde karşılaştırılarak değerlendirilmesi ve 2. Boyut ayırımın tekrarlanabilirliği



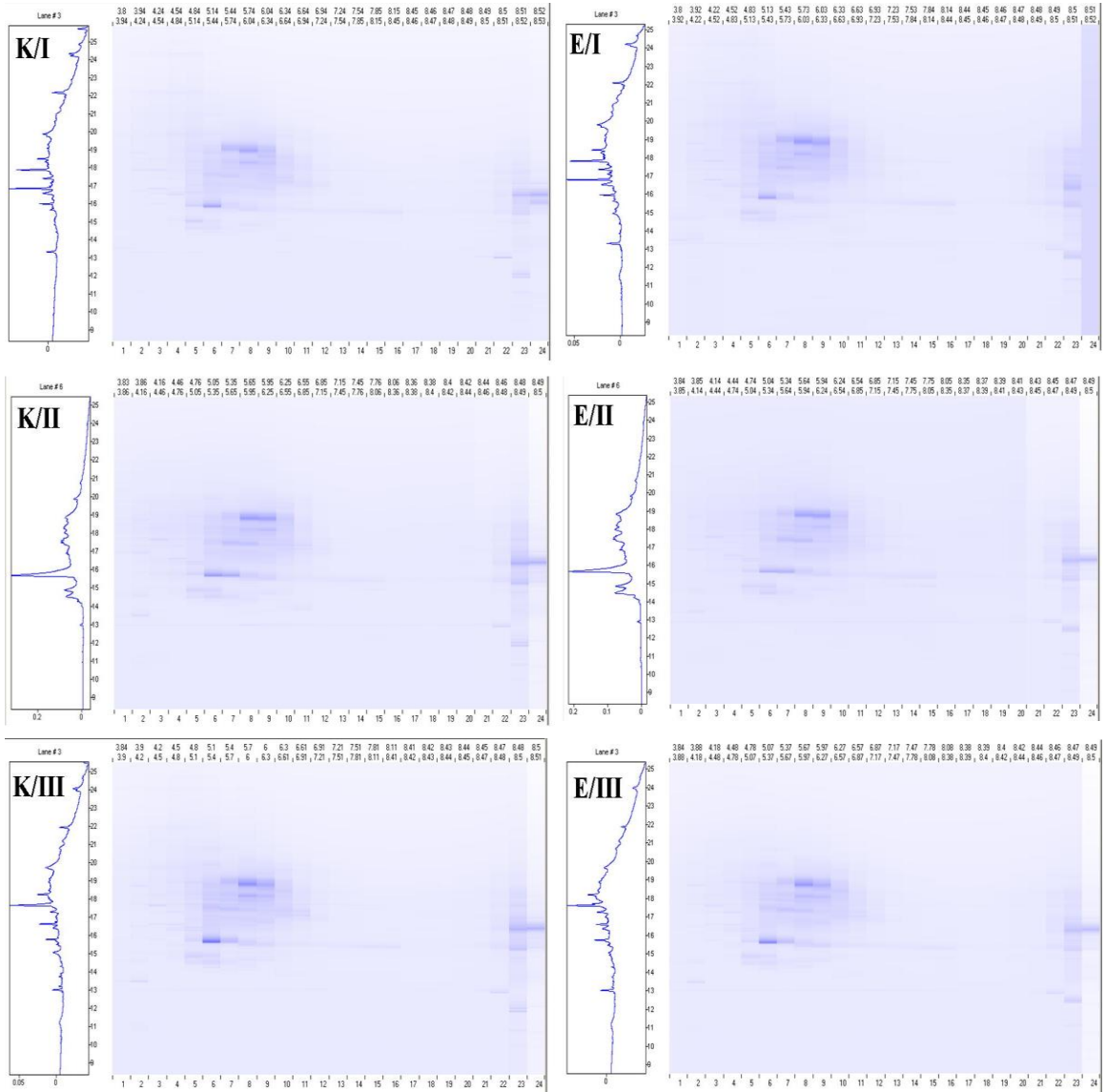
Şekil 3.11 Seri82 24. Saat örneklerin biyolojik tekrarları arasında 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması (K: Kontrol, E: Enfekte)



Şekil 3.12 Seri82 48. Saat örneklerin biyolojik tekrarları arasında 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması (K: Kontrol, E: Enfekte)



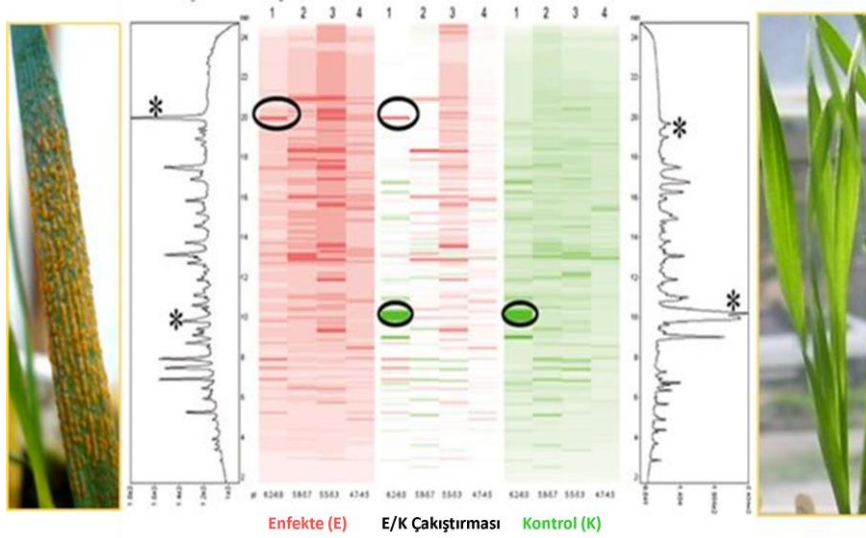
Şekil 3.13 Seri82 72. Saat örneklerin biyolojik tekrarları arasında 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması (K: Kontrol, E: Enfekte)



Şekil 3.14 Seri82 96. Saat örneklerin biyolojik tekrarları arasında 2 boyutlu sanal jel haritalarının karşılaştırılması (K: Kontrol, E: Enfekte)

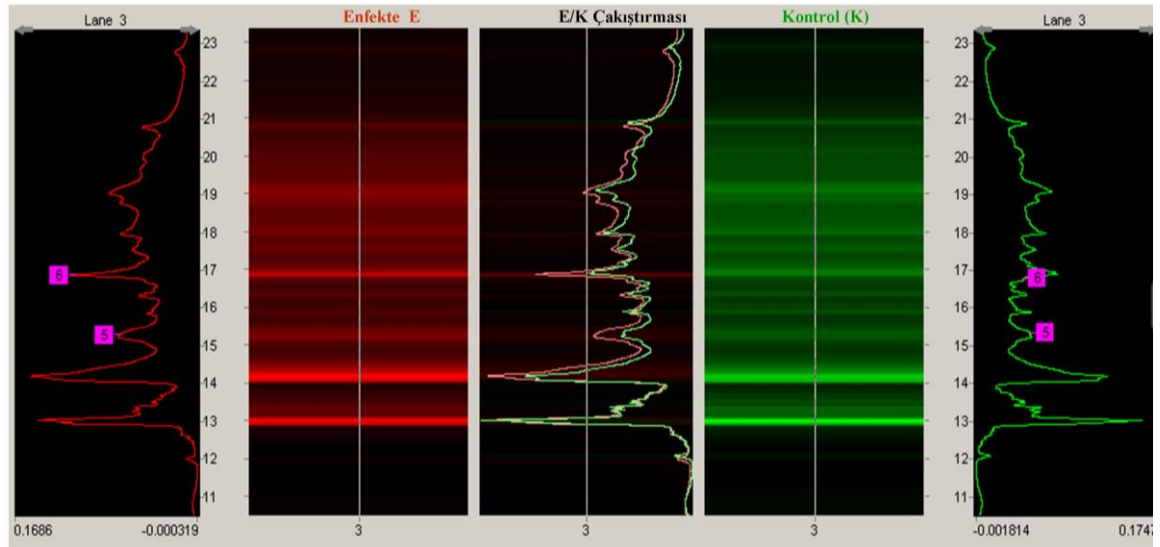
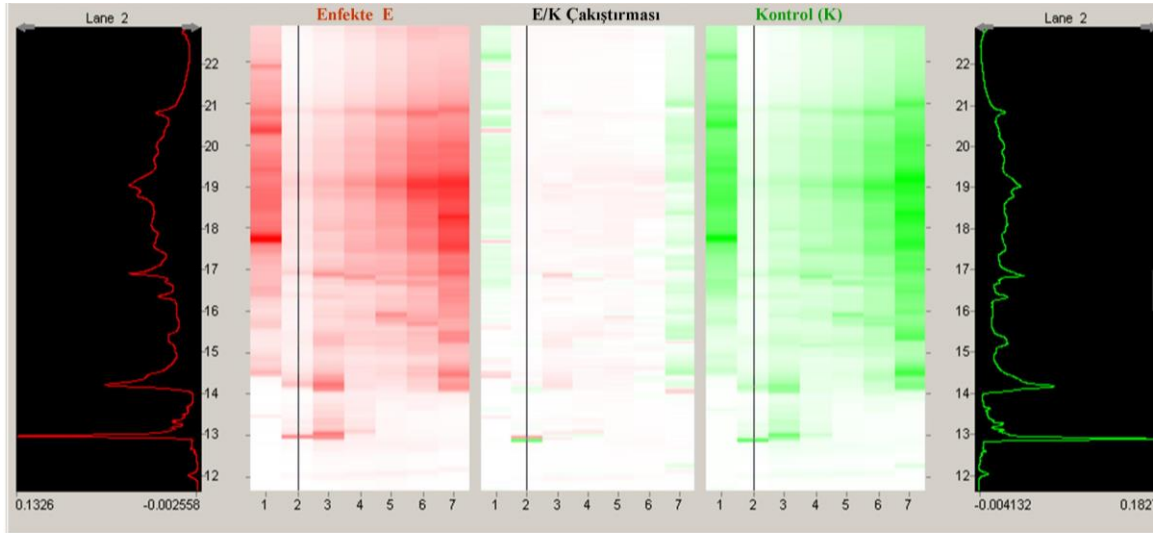
3.3.2 Enfekte ve Kontrol Protein Profillerinin Karşılaştırılması

ProteoVue yazılımı ile her bir örnek için oluşturulan iki boyutlu sanal jel haritaları DeltaVue yazılımında kontrol/enfekte olacak şekilde eşleştirilip karşılaştırılarak değerlendirildi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 DeltaVue yazılımı ile enfekte/kontrol sanal jel haritaları karşılaştırılarak anlatım düzeyi farklı proteinlerin seçilimi (işaretli pikler ekspresyon farkı olan proteinleri ifade etmektedir)

Bu karşılaştırılma sonucunda kontrole göre enfekte örneklerde anlatım düzeyi farklı olan proteinler belirlendi ve tanımlanmak üzere seçildi. Karşılaştırılan kromatogramlarda her pik bir proteini, pik alanı ise ekspresyon miktarını temsil etmektedir [104]. Bu karşılaştırmalar, her bir biyolojik tekrar için kontrol/enfekte örneklerinin her bir fraksiyonunda tek tek tüm protein pikleri eşleştirilerek gerçekleştirildi. Eşleştirilen protein piklerinin alanları karşılaştırılarak ekspresyon farkları belirlendi. Bu karşılaştırmalar sonucunda 24. saat örnekler için 897, 48. saat örnekler için 714, 72. saat örnekler için 1045 ve 96. saat örnekler için 726 protein piki karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu eşleştirmelerde her üç biyolojik tekrarda da aynı ekspresyon farkının olduğu, protein piklerinin alanları farkı ≥ 2 olanlar MS analizi için seçildi. Buna göre 24. saat için 30, 48. saat için 34, 72. saat için 66 ve 96. saat için ise 37 pik seçildi (Şekil 3.15) ve bulundukları fraksiyonlar nanoLC-ESI-MS/MS analizi için Bölüm 2.4’de anlatıldığı şekilde hazırlandı.



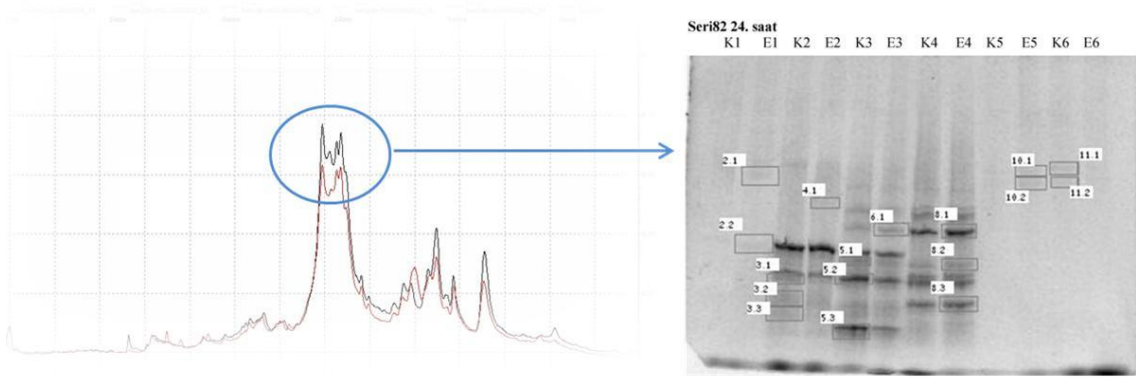
Şekil 3.16 Enfekte/kontrol sanal jel haritaları çakıştırılarak anlatım düzeyinde anlamlı farklılık gösteren proteinlerin seçilimi

3.4 Proteinlerin Tanımlanması

PF2D sisteminde ayrılan ve enfekte bitkilerde kontrole göre anlatım farklılığı belirlenmiş proteinlerin bir kısmı doğrudan bir kısmı ise 3. boyut ayırım sonrasında Bölüm 2.4'de anlatıldığı biçimde MS analizine hazırlandı.

Seçilen pikleri içeren fraksiyonların bir kısmında birden fazla protein varlığı söz konusu olduğundan bu fraksiyonlarda bulunan proteinler III. boyut ayırında SDS-PAGE ile

moleküler ağırlığına göre de ayrıldı (Şekil 3.17). Protein miktarında fark görülen bantlar jelden kesilerek MS analizlerine hazırlandı.



Şekil 3.17 Birden fazla protein piki içerdiği görülen fraksiyonlarda yapılan SDS-PAGE analizi

(K: Kontrol, E: Enfekte örnekleri, numaralar ise pik numarasını temsil etmektedir)

Bu proteinler tripsinle kesilerek triptik peptidlere ayrıldı ve nanoLC-ESI-MS/MS sisteminde PLGS yazılımı ile analiz edildi. NanoLC-ESI-MS/MS'den elde edilen triptik peptidlere ait kütle/yük verileri ve amino asit dizi bilgisi Uniprot buğday ve Broad Institute Puccinia veritabanlarında tarandı. Taramalar sonucunda 24. saat örnekleri için tanımlanan proteinler ve detay bilgileri Çizelge 3.1'de, 48. saat örnekleri için tanımlanan proteinler ve bilgileri Çizelge 3.2'de, 72. saat örnekleri için tanımlanan proteinler ve bilgileri Çizelge 3.3'de, 96. saat örnekleri için tanımlanan proteinler ve bilgileri Çizelge 3.4'de verildi.

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
1	1/<4.0	Artma	EGP84165.1	Geranylgeranyl diphosphate synthase 3	Metabolizma	5.67	40208	10.2	29	2	<i>Mycospha. graminicola</i>
2	1/<4.0	Artma	AF491837_1	WCOR14c	Stres/Soğuk stresi	4.55	13596	28.5	13	3	<i>Triticum aestivum</i>
3	3/ 4.47-4.77	Azalma	AF251264_1	RuBisCo activase B	Fotosentez/Calvin cycle	7.16	47784	3.4	35	2	<i>Triticum aestivum</i>
4	3/ 4.47-4.77	Azalma	AAM92707.1	Putative glycine decarboxylase sub.	Metabolizma	4.80	21236	45.7	12	11	<i>Triticum aestivum</i>
5	3/ 4.47-4.77	Azalma	CAB56544.1	Phosphoribulokinase	Metabolizma/Karbohidrat	5.64	45112	16.8	29	4	<i>Triticum aestivum</i>
6	3/ 4.47-4.77	Azalma	ACA63887.1	RuBisCo oxygenase large sub	Fotosentez	6.22	52817	25.7	42	9	<i>Triticum aestivum</i>
7	4/4.77-5.07	Artma	AF255053_1	Cold responsive LEA RAB related COR protein	Stres/Soğuk stresi	4.65	17150	18.6	26	5	<i>Triticum aestivum</i>
8	4/4.77-5.07	Artma	CAB50787.2	Putative glyoxalase I	Metabolizma	5.18	31658	31.3	17	8	<i>Triticum aestivum</i>
9	4/4.77-5.07	Artma	AFF27605.1	Chloroplast Cu Zn SOD	Savunma/Antioksidan	5.06	17525	27.0	9	2	<i>Triticum aestivum</i>
10	4/4.77-5.07	Artma	ABJ15732.1	S adenosyl methionine synthetase 2	Metabolizma	7.48	31431	26.6	23	7	<i>Triticum monococcum</i>
11	4/4.77-5.07	Artma	ADK35122.1	Profilin	Sinyal iletimi	4.70	14182	40.4	8	6	<i>Triticum aestivum</i>
12	4/4.77-5.07	Azalma	CAD30024.2	Ferredoxin NADP H oxidoreductase	Elektron transportu	8.12	38781	24.3	33	9	<i>Triticum aestivum</i>
13	5/5.07-5.37	Azalma	S16260	Photosystem II oxygen evolving complex protein	Fotosentez	8.79	34718	26.4	25	6	<i>Triticum aestivum</i>
14	5/5.07-5.37	Azalma	CAA40669.1	23kDa oxygen evolving protein of photosystem	Fotosentez	9.00	27252	42.6	21	6	<i>Triticum aestivum</i>
15	5/5.07-5.37	Azalma	ABI96906.1	Chloroplast RuBisCo activase	Fotosentez	6.52	40034	17.5	30	4	<i>Triticum aestivum</i>
16	5/5.07-5.37	Artma	AAP83583.1	Cytosolic glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Metabolizma/Glikoliziz	6.36	18167	35.1	14	4	<i>Triticum aestivum</i>
17	7/5.67-5.97	Artma	ACB55492.1	Flavanone 3 hydroxylase	Savunma/Flavonoid yolağı	8.41	32371	19.6	28	3	<i>Triticum aestivum</i>
18	7/5.67-5.97	Artma	AAB70258.1	Actin	Yapı	5.07	41789	23.4	35	6	<i>Mayetiola destructor</i>
19	7/5.67-5.97	Azalma	BAF79926.1	Group3 LAE. protein	Stres/Soğuk stresi	4.80	18313	83.0	25	15	<i>Triticum aestivum</i>

Çizelge 3.1 Yirmidördüncü saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
20	7/5.67-5.97	Artma	AFD18719.1	Recombinase A	Metabolizma/ Nükleik asit,DNA tamiri	5.32	37242	7.6	21	3	<i>Pseudom fluorescens</i>
21	7/5.67-5.97	Artma	AAA75104.1	Single stranded nucleic acid binding protein	Metabolizma/Nükleik asit	4.97	16245	29.3	12	9	<i>Triticum aestivum</i>
22	7/5.67-5.97	Azalma	BAF30986.1	Glycine rich RNA binding protein	Metabolizma/Nükleik asit	6.77	15986	41.1	17	9	<i>Triticum aestivum</i>
23	8/5.97-6.28	Artma	ZP_07778413.1	Oxaloacetate decarboxylase alpha sub.	Metabolizma	5.29	65537	8.9	46	4	<i>Pseudom fluorescens</i>
24	8/5.97-6.28	Artma	EFQ64083.1	Methyl accepting chemotaxis protein	Saldırı	5.33	71435	15.2	50	5	<i>Pseudom fluorescens</i>
25	8/5.97-6.28	Artma	ZP_07774964.1	Protein tyrosine kinase	Sinyal iletimi	6.01	81107	10.5	65	5	<i>Pseudom fluorescens</i>
26	8/5.97-6.28	Artma	ZP_07773456.1	Dipeptide transport system permease protein	Transporter/ ABC transporter	7.53	37023	15.1	20	3	<i>Pseudom fluorescens</i>
27	8/5.97-6.28	Artma	ZP_07776404.1	Amine oxidase flavin containing	Bilinmiyor	5.79	57354	21.6	45	8	<i>Pseudom fluorescens</i>
28	8/5.97-6.28	Artma	AAY44603.1	Stress responsive protein	Stres proteini	7.81	22159	5.12	19	1	<i>Triticum aestivum</i>
29	8/5.97-6.28	Artma	AEM36336.1	Mitochondrial SOD	Savunma/Antioksidan	7.87	25331	34.6	15	5	<i>Triticum aestivum</i>
30	8/5.97-6.28	Artma	AAC62115.1	Manganese SOD	Savunma/Antioksidan	7.00	24548	37.9	14	5	<i>Triticum aestivum</i>
31	8/5.97-6.28	Artma	AFF27607.1	Cytosolic Cu Zn SOD	Savunma/Antioksidan	5.69	15082	89.4	8	8	<i>Triticum aestivum</i>
32	8/5.97-6.28	Artma	AAL71854.1	Dehydroascorbate reductase	Savunma	5.85	23343	56.6	18	9	<i>Triticum aestivum</i>
33	20/>8.5	Artma	AAS49905.2	Putative proteinase inhibitor related protein	Protein metabolizması	8.31	9592	37.7	5	4	<i>Triticum aestivum</i>
34	21/>8.5	Artma	ACU29529.1	Cytochrome oxidase sub. I	Elektron transportu	5.87	2284	30.9	6	3	<i>Pardosa palustris</i>
35	22/>8.5	Artma	ZP_07773687.1	Permease YjgP YjgQ	Bilinmiyor	9.51	41477	27.1	25	4	<i>Pseudom fluorescens</i>
36	22/>8.5	Artma	EFQ62190.1	Flagellar protein FliO FliZ	Saldırı	10.76	15351	38.1	10	4	<i>Pseudom fluorescens</i>
37	23/>8.5	Artma	ABA42174.1	NapB	Metabolizma	7.76	18206	33.9	14	2	<i>Pseudomo. stutzeri</i>
38	24/>8.5	Artma	CBC88792.1	CCAAT-box transcription factor complex WHAP8	Tanskripsiyon	9.56	26414	18.5	13	3	<i>Triticum aestivum</i>

Çizelge 3.1'in Devamı Yirmidördüncü saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
1	1/ <4.0	Artma	AFF19563.1	Superoxide Dismutase(SOD)	Savunma/Antioksidan	5.2	20238	30.9	11	3	<i>Triticum aestivum</i>
2	1/ <4.0	Artma	AEY83981.1	Heat Shock Protein 70	Stres	4.8	73495	22.4	63	10	<i>Triticum aestivum</i>
3	1/ <4.0	Artma	AAM08320.1	Small Ran Related GTP Binding Protein	Sinyal İletimi	6.7	25117	39.3	17	11	<i>Triticum aestivum</i>
4	1/ <4.0	Artma	AAN77157.1	Thylakoid Bound Ascorbate Peroxidase	Savunma/Peroksidaz	5.3	41301	24.3	36	7	<i>Triticum aestivum</i>
5	1/ <4.0	Artma	AEN02610.1	Pyrroloquinoline Quinone Synthase Partial Uncult.	Metabolizma	5.2	19376	30.9	17	3	<i>Pseudomo.spp.</i>
6	1/ <4.0	Artma	1109190A	Calmodulin	Sinyal İletimi	3.89	16818	79	22	9	<i>Triticum aestivum</i>
7	1/ <4.0	Artma	ABQ18237.1	Translationally Controlled Tumor Protein	Sinyal İletimi	4.35	18766	28.5	20	4	<i>Triticum aestivum</i>
8	3/ 4.07-4.38	Artma	AF334185_1	Lipid Transfer Protein Prec.	Savunma	9.47	11250	41.7	6	4	<i>Triticum aestivum</i>
9	3/ 4.07-4.38	Azalma	ACO71288.1	Cp31bhv	Metabolizma/Nükleik Asit	4.65	18993	40.5	12	5	<i>Triticum aestivum</i>
10	3/ 4.07-4.38	Artma	CAI10733.1	Endoxylanase Precursor	Saldırı	9.31	25528	17.9	16	1	<i>Gibberella zeae</i>
11	3/ 4.07-4.38	Artma	EFQ65621.1	Outer Membrane Fimbrial Usher Porin	Transporter	6.5	91986	13.8	62	7	<i>Pseudomo. fluorescens</i>
12	3/ 4.07-4.38	Azalma	ABO70330.1	Putative Oxygen Evolving Complex Prec.	Fotosentez	10.1	2126	33.5	19	6	<i>Triticum aestivum</i>
13	3/ 4.07-4.38	Azalma	ABO37960.1	Peptidylprolyl Isomerase	Metabolizma	9.7	25913	44.0	17	7	<i>Triticum aestivum</i>
14	3/ 4.07-4.38	Artma	AF491838_1	Wcor14a	Stres/Soğuk Stresi	4.65	13536	45.0	13	4	<i>Triticum aestivum</i>
15	4/4.38-4.68	Artma	AF207545_1	Cold Responsive Protein COR14a	Stres/Soğuk Stresi	4.65	13536	45.0	13	5	<i>Triticum aestivum</i>
16	4/4.38-4.68	Azalma	BAB47086.1	PSI 9kda Protein	Fotosentez/Elektron transportu	6.67	8893	71.6	7	4	<i>Triticum aestivum</i>
17	4/4.38-4.68	Artma	S16260	Photosystem II Oxygen Evolving Complex Protein	Fotosentez	8.79	34718	36.6	25	8	<i>Triticum aestivum</i>
18	4/4.38-4.68	Artma	AAC49404.1	Wcor719	Stres/Soğuk Stresi	4.27	15754	52.8	19	6	<i>Triticum aestivum</i>

Çizelge 3.2 Kırksekinzi saat örneklerde tanımlanan proteinler

Çizelge 3.2'in Devamı Kırksekizinci saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
19	4/4.38-4.68	Artma	BAF02546.1	Triticain Alpha	Protein metabolizması	4.82	50374	11.71	26	4	<i>Triticum aestivum</i>
20	5/4.68-4.98	Artma	AF255053_1	Cold Responsive LEA RAB Related COR Protein	Stres/Soğuk Stresi	4.65	17150	33.1	26	6	<i>Triticum aestivum</i>
21	5/4.68-4.98	Artma	ADW41578.1	Group 3 LEA Protein	Stres/Soğuk stresi	5.72	19738	36.5	26	6	<i>Triticum aestivum</i>
22	7/5.28-5.58	Azalma	AF251264_1	Rubisco Activase B	Fotosentez	7.16	47784	14.3	35	3	<i>Triticum aestivum</i>
23	8/5.58-5.88	Artma	AAV66923.1	Peroxiredoxin Q	Savunma/Peroksidaz	10.0	23349	16.1	19	5	<i>Triticum aestivum</i>
24	8/5.58-5.88	Artma	AEP33645.1	RNA Binding Ras GAP SH3 Binding Protein	Metabolizma/Nükleik Asit	4.88	48119	9.86	22	3	<i>Triticum aestivum</i>
25	9/5.88-6.18	Artma	AFF27606.1	Chloroplast Cu Zn SOD Part.	Savunma/Antioksidan	5.06	17525	68.3	16	9	<i>Triticum aestivum</i>
26	9/5.88-6.18	Artma	AFF27609.1	Cytosolic Cu Zn SOD	Savunma/Antioksidan	5.69	15082	61.8	8	5	<i>Triticum aestivum</i>
27	9/5.88-6.18	Azalma	AET34448.1	Metacaspase 4	Savunma/Proteolizis	5.01	43915	13.5	30	4	<i>Triticum aestivum</i>
28	9/5.88-6.18	Artma	EFQ66144.1	Carbonic Anhydrase	Metabolizma	6.91	26459	12.7	12	2	<i>Pseudom.fluoresce.</i>
29	9/5.88-6.18	Artma	ZP_07777134.1	Cation Transporter	Transporter	6.19	38063	10.6	21	1	<i>Pseudom.fluoresce</i>
30	9/5.88-6.18	Artma	BAF97630.1	Agmatine Coumaroyl Transf.	Savunma	4.88	40779	29.3	26	7	<i>Triticum aestivum</i>
31	9/5.88-6.18	Artma	CAD30025.1	Ferredoxin NADP H Oxidoreductase	Elektron transportu	7.12	40206	42.6	35	13	<i>Triticum aestivum</i>
32	10/6.18-6.48	Artma	AAZ67145.2	Geranylgeranyl Hydrogenase	Metabolizma	9.4	50536	21.21	41	8	<i>Triticum aestivum</i>
33	10/6.18-6.48	Artma	CAA64077.1	Catalase	Savunma/Peroksidaz	6.6	56444	12.19	35	5	<i>Triticum aestivum</i>
34	10/6.18-6.48	Artma	AAL47688.1	Glutathione S Transferase 19E50	Savunma/Peroksidaz	5.97	24900	19.17	16	3	<i>Triticum aestivum</i>
35	10/6.18-6.48	Artma	BAA19099.1	Thiol Specific Antioxidant Protein	Savunma/Antioksidan	5.6	23312	15.2	18	2	<i>Triticum aestivum</i>
36	24/ >8.5	Artma	CAZ76054.1	Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase	Metabolizma	6.78	36504	24.6	23	6	<i>Triticum aestivum</i>
37	24/ >8.5	Artma	AAW52722.1	Peroxidase 8	Savunma/Peroksidaz	6.64	37543	26.6	27	4	<i>Triticum monococ.</i>
38	24/ >8.5	Artma	ABN50913.1	Manganese SOD	Savunma/Antioksidan	6.85	19307	21.2	12	3	<i>Triticum aestivum</i>
39	24/ >8.5	Artma	EFQ60857.1	Dethiobiotin Synthetase	Yapı	6.41	23388	36.7	14	5	<i>Pseudom.fluoresce.</i>
40	24/ >8.5	Artma	ADM65810.1	Rust resistance kinase Lr10	Savunma/Dayanıklılık	5.54	103737	3.15	82	2	<i>Triticum dicoccol.</i>

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
1	1/ <4.0	Artma	PGTG_00818T0	Hypothetical protein 253 aa	Bilinmiyor	56.2	28.7	210	27	3	<i>Pucci. graminis f sp tritici</i>
2	1/ <4.0	Artma	AAM92706.1	Cytochrome c oxidase sub.	Elektron transportu	42.1	17.4	649	11	7	<i>Triticum aestivum</i>
3	1/ <4.0	Artma	XP_003554549.1	Calvin cycle protein CP12	Fotosentez/Calvin cycle	42.8	13208	460.3	15	4	<i>Hordeum vulgare</i>
4	1/ <4.0	Artma	ACO71288.1	Cp31BHv	Metabolizma/Karbohidrat	46.5	18993	558	12	7	<i>Triticum aestivum</i>
5	1/ <4.0	Artma	AAR89812.1	14 3 3 prot. (TaWIN1, Bmh2)	Sinyal iletimi/Regülatör	46.3	29273	394.6	30	9	<i>Triticum aestivum</i>
6	1/ <4.0	Artma	XP_003853918.1	Hypothetical protein	Bilinmiyor	101.6	14981	89.5	14	2	<i>Zymoseptoria tritici</i>
7	1/ <4.0	Artma	EFQ64252.1	Glycoside hydrolase 15 like	Metabolizma	52.9	68397	151.3	37	8	<i>Pseudom. fluorescens</i>
8	1/ <4.0	Artma	EGP85165.1	RNA binding zinc finger protein RanBP2 type	Metabolizma	68.5	71171	122.7	31	4	<i>Mycospha.graminicola</i>
9	1/ <4.0	Artma	XP_002544250.1	Transaldolase	Metabolizma/Enerji	56.4	35759	117.2	28	4	<i>Zymoseptoria tritici</i>
10	2/4.00-4.23	Azalma	ZP_07776434.1	Integration host fact. α sub.	Transkripsiyon	98.3	11469	19.0	12	2	<i>Pseudom. fluorescens</i>
11	2/4.00-4.23	Artma	ACL13515.1	Ferredox.nitrite reduct.prec.	Metabolizma/Nitrojen	68.9	66076	437.1	53	21	<i>Triticum aestivum</i>
12	2/4.00-4.23	Artma	ABO40324.1	Bp2A protein	Metabolizma	5.75	25716	273.1	19	5	<i>Triticum turgidum</i>
13	2/4.00-4.23	Artma	EAT81150.1	Hypothe. prot. SNOG 11442	Bilinmiyor	87.5	49963	15.6	26	1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
14	2/4.00-4.23	Artma	CAB56544.1	Phosphoribulokinase	Metabolizma/Karbohidrat	56.4	45112	616.3	29	24	<i>Triticum aestivum</i>
15	3/4.24-4.54	Artma	ZP_07774948.1	Isochorismatase hydrolase	Saldırı	5.21	16605	36.18	8	3	<i>Pseudom. fluorescens</i>
16	3/4.24-4.54	Artma	CBH50687.1	Hypothetical protein	Bilinmiyor	9.11	19855	28.33	15	3	<i>Puccinia graminis</i>
17	3/4.24-4.54	Artma	AET49324.1	ATP dependent Clp protease proteolytic subunit	Protein Metabolizması	4.87	21839	12.24	13	1	<i>Pinus dalatensis</i>
18	3/4.24-4.54	Artma	PGTG_02687T0	Hypothetical protein 267 aa	Bilinmiyor	8.11	29140	31.57	11	2	<i>Puccinia graminis</i>
19	3/4.24-4.54	Artma	PGTG_11681T0	Hypothetical protein 131 aa	Bilinmiyor	7.93	13662	53.84	8	2	<i>Puccinia graminis</i>
20	3/4.24-4.54	Artma	PTTG_10448T0	Hypothetical protein 131 aa	Bilinmiyor	7.32	30917	19.93	14	2	<i>Puccinia graminis</i>
21	3/4.24-4.54	Artma	AAA16282.2	Cold acclimat. prot.WCS19	Stres/Soğuk stresi	5.40	14605	31.29	17	4	<i>Triticum aestivum</i>

Çizelge 3.3 Yetmişikinci saat örneklerde tanımlanan proteinler

Çizelge 3.3'ün Devamı Yetmişikinci saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
22	3/4.24-4.54	Azalma	AF207545_1	Cold respons. prot. COR14a	Stres/Soğuk stresi	4.65	13536	61.42	13	5	<i>Triticum aestivum</i>
23	3/4.24-4.54	Azalma	BAC56935.1	Chloropl. targeted COR prot.	Stres/Soğuk stresi	4.92	14734	10.20	17	1	<i>Triticum aestivum</i>
24	3/4.24-4.54	Azalma	ACM50322.1	Cold respons. prot.WCOR14	Stres/Soğuk stresi	4.55	13654	31.42	13	3	<i>Triticum aestivum</i>
25	3/4.24-4.54	Artma	PGTG_08938T0	Hypothetical protein 379 aa	Bilinmiyor	5.62	41615	2.38	18	1	<i>Puccinia graminis</i>
26	3/4.24-4.54	Artma	ACF08092.1	Class III peroxidase	Savunma/Peroksidaz	5.73	32884	8.86	21	3	<i>Triticum aestivum</i>
27	3/4.24-4.54	Artma	ACO90196.1	Ascorbate peroxidase	Savunma/Peroksidaz	5.44	26605	22.22	18	6	<i>Triticum aestivum</i>
28	3/4.24-4.54	Artma	PGTG_05488T0	Actin 376 aa	Yapı	5.16	41759	11.73	34	4	<i>Puccinia graminis</i>
29	4/4.54-4.84	Artma	AEU17711.1	Beta tubulin	Yapı	5.45	38622	17.14	23	4	<i>Fus.pseudograminearum</i>
30	4/4.54-4.84	Artma	ABV53950.1	Elongation factor 1 alpha	Protein Metabolizması	8.76	45144	24.69	29	8	<i>Marpesia eleucea</i>
31	4/4.54-4.84	Artma	PTTG_10901T0	Hypothetical protein 104 aa	Bilinmiyor	9.36	11475	30.76	11	3	<i>Puccinia triticina</i>
32	4/4.54-4.84	Artma	PTTG_04742T0	Hypothetical protein 136 aa	Bilinmiyor	11.56	15033	14.81	12	3	<i>Puccinia triticina</i>
33	4/4.54-4.84	Artma	PGTG_07231T0	Hypothetical protein 275 aa	Bilinmiyor	9.78	31219	27.73	28	7	<i>Puccinia graminis</i>
34	4/4.54-4.84	Artma	PGTG_17898T0	Hypothetical protein 339 aa	Bilinmiyor	6.00	37711	21.30	32	4	<i>Puccinia graminis</i>
35	4/4.54-4.84	Artma	PGTG_09435T0	Hypothetical protein 241 aa	Bilinmiyor	10.0	27073	13.33	23	3	<i>Puccinia graminis</i>
36	4/4.54-4.84	Artma	BAH20800.1	Protein disulfide isomerase	Sinyal iletimi/Şaperon	4.77	56635	46.21	49	21	<i>Triticum aestivum</i>
37	4/4.54-4.84	Artma	PGTG_03044T0	Hypothetical protein 858 aa	Bilinmiyor	8.23	96029	7.93	63	5	<i>Puccinia graminis</i>
38	4/4.54-4.84	Artma	NP_114265.1	ATP synth. CF1 epsilon sub.	Elektron transportu	5.01	15208	55.47	10	4	<i>Triticum aestivum</i>
39	4/4.54-4.84	Artma	PGTG_00630T0	Hypothetical protein 136 aa	Bilinmiyor	9.77	15198	32.59	9	3	<i>Puccinia graminis</i>
40	5/4.84-5.14	Artma	CAH69208.1	Type 1 non specif.LTP/PR14	Savunma	9.47	11250	27.82	6	3	<i>Triticum aestivum</i>
41	6/5.14-5.45	Artma	AF255053_1	Cold resp. LEA RAB related COR protein	Stres/Soğuk stresi	4.65	17150	62.04	26	10	<i>Triticum aestivum</i>
42	6/5.14-5.45	Artma	BAB18766.1	Cysteine proteinase inhibitor	Protein metabolizması/ Savunma	5.63	15711	31.69	11	4	<i>Triticum aestivum</i>
43	6/5.14-5.45	Artma	AAL47688.1	Glutathione S transferase	Savunma	5.97	24900	22.83	16	5	<i>Triticum aestivum</i>

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
44	6/5.14-5.45	Artma	ZP_07778103.1	Protein of unknown function UPF0001	Bilinmiyor	6.10	24560	57.89	22	8	<i>Pseudom. fluorescens</i>
45	6/5.14-5.45	Artma	ABB80380.1	Cystatin WC 1	Protein metabolizması/ Savunma	5.90	15685	27.46	11	5	<i>Triticum aestivum</i>
46	6/5.14-5.45	Artma	EGP90267.1	TRIOSEphosphate isomerase	Metabolizma	5.98	27026	27.41	27	4	<i>Mycospha.graminicola</i>
47	6/5.14-5.45	Azalma	AAB18208.1	Cold acclima. prot.WCOR615	Stres/Soğuk stresi	4.71	17773	17.71	19	3	<i>Triticum aestivum</i>
48	6/5.14-5.45	Azalma	CAA06735.1	Thioredoxin M	Elektron transportu	8.29	19119	38.85	18	11	<i>Triticum aestivum</i>
49	7/5.45-5.75	Azalma	AAP72269.1	Photosystem II polypeptide	Fotosentez/E. transportu	9.08	10187	23.23	5	6	<i>Triticum aestivum</i>
50	7/5.45-5.75	Artma	CAD30025.1	Ferredox.NADPHoxidoreduct	Elektron transportu	7.12	40206	38.29	35	15	<i>Triticum aestivum</i>
51	7/5.45-5.75	Azalma	BAD08701.1	Cold shock domain prot.3	Stres/Soğuk stresi	5.67	21530	29.00	14	4	<i>Triticum aestivum</i>
52	7/5.45-5.75	Artma	P83970.1	Plasma membrane ATPase - Proton pump	Elektron transportu	6.37	104618	7.67	68	10	<i>Triticum aestivum</i>
53	7/5.45-5.75	Azalma	S16260	Photosystem II oxygen evolving complex protein 1	Fotosentez	8.79	34718	43.69	25	15	<i>Triticum aestivum</i>
54	7/5.45-5.75	Azalma	P27665.1	Oxygen evolving enhancer prot.1 chloropl. ShortOEE1	Fotosentez	8.79	34718	40.00	25	13	<i>Triticum aestivum</i>
55	7/5.45-5.75	Azalma	CAA40669.1	23kDa oxygen evolving protein of photosystem II	Fotosentez	9.00	27252	65.89	21	24	<i>Triticum aestivum</i>
56	7/5.45-5.75	Artma	PGTG_17218T0	Malate dehydrogenase	Metabolizma	9.20	36943	30.02	27	9	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>
57	7/5.45-5.75	Artma	CAC94003.1	Glutathione transferase	Savunma/Peroksidaz	6.38	24995	39.18	17	10	<i>Triticum aestivum</i>
58	8/5.75-6.05	Azalma	Q00434.1	Oxygen evolving enhancer protein 2	Fotosentez	9.00	27252	55.81	21	16	<i>Triticum aestivum</i>
59	8/5.75-6.05	Artma	AAP12730.1	Sulfur rich thionin like protein/PR13	Savunma	6.29	9805	20	9	2	<i>Triticum aestivum</i>
60	8/5.75-6.05	Artma	ADW41578.1	Group 3 LEA protein	Stres/Soğuk stresi	5.72	19738	35.44	26	9	<i>Triticum aestivum</i>
61	9/6.05-6.35	Artma	ADF83496.1	Catalase	Savunma	6.54	56772	10.77	32	4	<i>Triticum aestivum</i>

Çizelge 3.3'ün Devamı Yetmişikinci saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
62	9/6.05-6.35	Artma	ABV24865.1	Dehydrin WZY1 2	Stres/Soğuk stresi	5.02	28166	26.71	23	5	<i>Triticum aestivum</i>
63	9/6.05-6.35	Artma	AAB18202.1	Cold acclim. prot.WCOR410c	Stres/Soğuk stresi	5.03	27928	41.31	21	7	<i>Triticum aestivum</i>
64	10/6.35-6.65	Artma	AAV66923.1	Peroxiredoxin Q	Savunma/Peroksidaz	10.02	23349	60.36	19	18	<i>Triticum aestivum</i>
65	10/6.35-6.65	Artma	AEH25617.1	PR 1 2	Savunma	8.26	17554	21.95	11	3	<i>Triticum aestivum</i>
66	10/6.35-6.65	Azalma	CAA31555.1	Photosystem I 8 kDa subunit	Fotosentez/E. transportu	6.67	8893	50.61	7	4	<i>Triticum aestivum</i>
67	10/6.35-6.65	Artma	ABL95195.1	Photosystem I subunit C	Fotosentez/E. transportu	6.67	8893	71.60	7	5	<i>Triticum aestivum</i>
68	10/6.35-6.65	Artma	AAB68035.1	Manganese SOD	Savunma/Antioksidan	8.77	25259	25.10	14	3	<i>Triticum aestivum</i>
69	10/6.35-6.65	Artma	AF251264_1	RuBisCo carboxylase activ.B	Fotosentez	7.16	47784	18.05	35	8	<i>Triticum aestivum</i>
70	10/6.35-6.65	Artma	Q7X9A6.1	Cytochrome b6 f complex iron sulfur subunit	Elektron transportu	8.17	23711	57.65	19	12	<i>Triticum aestivum</i>
71	11/6.65-6.95	Artma	CAA07473.1	PR 1 1	Savunma	8.50	17639	24.39	12	3	<i>Triticum aestivum</i>
72	11/6.65-6.95	Artma	AEV53931.1	MADS box transcript. factor	Transkripsiyon/Regülatör	9.51	30337	10.03	22	3	<i>Triticum aestivum</i>
73	12/6.95-7.25	Artma	CBH32568.1	BolA like prot. domain containing prot. expressed	Transkripsiyon	5.41	10066	25.77	4	1	<i>Triticum aestivum</i>
74	12/6.95-7.25	Artma	NP_043088.1	Photosystem I subunit VII	Fotosentez/E. transportu	6.82	8902	35.80	7	3	<i>Zea mays</i>
75	12/6.95-7.25	Artma	EGP92301.1	Monomeric glyoxalase I	Metabolizma	5.60	36895	8.38	29	3	<i>Mycospha.graminicola</i>
76	22/>8.50	Artma	EGP84100.1	Gamma actin	Yapı	5.33	41610	10.13	34	3	<i>Mycospha.graminicola</i>
77	22/>8.50	Artma	AAQ82627.2	Resistance related RLK	Savunma	7.04	72503	7.98	48	3	<i>Triticum aestivum</i>
78	22/>8.50	Artma	AF093007_1	PR 4	Savunma	7.00	13100	10.83	6	1	<i>Triticum aestivum</i>
79	22/>8.50	Artma	AEH25618.1	PR 1 3	Savunma	8.50	17639	57.31	12	7	<i>Triticum aestivum</i>
80	23/>8.50	Artma	AAA50848.1	Wali3	Protein metabolizması/ Proteaz inhibitör	8.31	9489	55.68	8	3	<i>Triticum aestivum</i>
81	23/>8.50	Artma	AAA50850.1	Wali5	Protein metabolizması/ Proteaz inhibitör	7.95	9511	41.57	6	5	<i>Triticum aestivum</i>
82	23/>8.50	Artma	PGTG_12201T0	Hypothetical protein 63 aa	Bilinmiyor	9.15	6676	40.32	6	2	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
83	23/>8.50	Azalma	ABO70330.1	Put. oxygen evol. complex	Fotosentez	10.14	21126	28.42	19	5	<i>Triticum aestivum</i>
84	23/>8.50	Artma	CAA53626.1	Endochitinase	Savunma	7.21	33580	38.75	15	8	<i>Triticum aestivum</i>
85	23/>8.50	Artma	ACO44684.1	Fructose bisphosph.aldolase	Metabolizma/Glikoliziz	6.99	38768	52.79	27	18	<i>Triticum aestivum</i>
86	23/>8.50	Artma	ADR66960.1	NFXL1	Trankripsiyon /Savunma baskılayıcı	7.58	22026	23.33	14	3	<i>Triticum aestivum</i>
87	23/>8.50	Artma	EAT89045.1	Hypoth.protein SNOG 03840	Bilinmiyor	10.55	18024	10.49	15	1	<i>Phaeospha. nodorum</i>
88	23/>8.50	Artma	BAB82471.1	Chitinase 1	Savunma	8.36	27059	29.68	21	6	<i>Triticum aestivum</i>
89	23/>8.50	Artma	AF302788_1	LTP precursor/PR14	Savunma	9.49	11204	48.69	6	7	<i>Triticum aestivum</i>
90	24/>8.50	Artma	ACA63887.1	RuBisCo oxygen.large sub.	Fotosentez/Calvin cycle	6.22	52817	21.38	42	14	<i>Triticum aestivum</i>
91	24/>8.50	Artma	EGP86232.1	Hypothetical protein	Bilinmiyor	5.03	119340	3.35	96	3	<i>Mycospha.graminicola</i>
92	24/>8.50	Artma	CAA51931.1	Phosphoglycerate kinase	Metabolizma/Karbohidrat	6.64	49808	22.29	44	8	<i>Triticum aestivum</i>
93	24/>8.50	Artma	EAT76651.1	Hypoth.protein SNOG 16072	Bilinmiyor	10.52	9225	27.71	6	2	<i>Phaeospha. nodorum</i>
94	24/>8.50	Artma	EAT79334.2	Hypoth.protein SNOG 13450	Bilinmiyor	9.08	69979	11.04	58	5	<i>Phaeospha. nodorum</i>
95	24/>8.50	Artma	CAA40670.1	33kDa oxygen evolving protein of photosystem II	Fotosentez	8.79	34718	46.46	25	20	<i>Triticum aestivum</i>
96	24/>8.50	Artma	BAB47046.1	Cytochrome f	Elektron transportu	8.11	35310	45.62	27	13	<i>Triticum aestivum</i>
97	24/>8.50	Artma	EAT76266.1	Hypoth. Prot. SNOG 16280	Bilinmiyor	8.68	17249	14.37	12	2	<i>Phaeospha. nodorum</i>
98	24/>8.50	Artma	PGTG_16792T0	Hypothetical protein 843 aa	Bilinmiyor	5.44	94045	8.55	77	6	<i>Puccinia graminis</i>
99	24/>8.50	Artma	AF475110_1	Oxygen evol. complex prec.	Fotosentez	10.38	20108	37.76	15	17	<i>Triticum aestivum</i>
100	24/>8.50	Artma	BAB47086.1	Photosystem I iron-sulfur center, 9kDa protein	Fotosentez/Elektron transportu	6.67	8893	80.24	7	9	<i>Triticum aestivum</i>
101	24/>8.50	Artma	AEH25619.1	PR 1 4	Savunma	8.51	17525	38.41	12	4	<i>Triticum aestivum</i>
102	24/>8.50	Artma	ADB92599.1	Ozone responsive stress related protein	Stres proteini	9.63	8665	50.63	6	2	<i>Triticum aestivum</i>
103	24/>8.50	Artma	PGTG_17820T0	Hypothetical protein 219 aa	Bilinmiyor	6.68	23685	20.64	18	3	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>

Çizelge 3.3'ün Devamı Yetmişikinci saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accession No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
1	2/3.90-4.20	Artma	AF475110_1	Oxygen evolving complex p.	Fotosentez	10.3	20108	27.65	15	5	<i>Triticum aestivum</i>
2	2/3.90-4.20	Artma	EAT79438.1	Hypothetical protein SNOG 13111	Bilinmiyor	11.1	20024	20.32	17	2	<i>Phaeospha. nodorum</i>
3	2/3.90-4.20	Azalma	AAM92706.1	Putative cytochrome c oxidase subunit	Elektron Transportu	4.2	17477	83.43	11	14	<i>Triticum aestivum</i>
4	2/3.90-4.20	Azalma	XP_003567583.1	Calvin cycle protein CP12-like	Fotosentez/Calvin cycle	4.2	13208	46.03	15	4	<i>Brachypod.distachyon</i>
5	2/3.90-4.20	Azalma	CAA40670.1	33kDa oxygen evolving protein of photosystem II	Fotosentez	8.7	34718	43.38	25	16	<i>Triticum aestivum</i>
6	2/3.90-4.20	Azalma	AAL30396.1	Small Ras-related GTP-binding protein	Sinyal İletimi	6.7	25117	74.66	17	11	<i>Triticum aestivum</i>
7	2/3.90-4.20	Azalma	AAM92707.1	Putative glycine decarboxylase subunit	Metabolizma	48.0	21236	20.39	12	3	<i>Triticum aestivum</i>
8	2/3.90-4.20	Azalma	P00228.2	Ferredoxin chloroplastic Flags Precursor	Metabolizma	4.3	15276	34.26	9	2	<i>Triticum aestivum</i>
9	2/3.90-4.20	Azalma	AF207545_1	Cold responsive protein COR14a	Stres/Soğuk Stresi	4.6	13536	31.42	13	3	<i>Triticum aestivum</i>
10	2/3.90-4.20	Artma	PTTG_10191T0	Hypothetical protein 216 aa-uncharacterized	Bilinmiyor	5.1	22854	18.13	17	3	<i>Puccinia triticina</i>
11	2/3.90-4.20	Artma	EAT76699.1	Hypothetical protein SNOG 15861	Bilinmiyor	4.9	14152	36.22	16	2	<i>Phaeospha. nodorum</i>
12	3/4.20-4.50	Azalma	S16260	Photosystem II oxygen evolving complex protein	Fotosentez/Elektron transportu	8.7	34718	24.30	25	6	<i>Triticum aestivum</i>
13	3/4.20-4.50	Azalma	AFV31408.1	Basic transcription factor 3	Transkripsiyon	5.4	19333	24.85	16	3	<i>Triticum aestivum</i>
14	3/4.20-4.50	Azalma	AF491838_1	WCOR14a	Stres/Soğuk stresi	4.6	13536	31.42	13	4	<i>Triticum aestivum</i>
15	3/4.20-4.50	Azalma	AAA16282.2	Cold acclimation protein WCS19	Stres/Soğuk stresi	5.4	14605	38.09	17	4	<i>Triticum aestivum</i>
16	4/4.50-4.80	Azalma	BAC56935.1	Chloroplast targeted COR protein	Stres/Soğuk stresi	4.9	14734	59.18	17	16	<i>Triticum aestivum</i>

Çizelge 3.4 Doksanaltıncı saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accesion No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
17	4/4.50-4.80	Azalma	CAI35908.1	Thioredoxin M precursor	Elektron transportu	8.2	19119	45.14	18	7	<i>Triticum durum</i>
18	4/4.50-4.80	Artma	ZP_07777294.1	Transcriptional regulator AraC family	Trankripsiyon	7.5	34718	5.50	26	2	<i>Pseudom. fluorescens</i>
19	6/5.10-5.40	Artma	ADW41578.1	Group 3 LEA protein	Stres/Soğuk stresi	5.7	19738	25.92	26	5	<i>Triticum aestivum</i>
20	11/6.61-6.91	Azalma	UCRIA_WHEAT_Q7X9A6.1	Cytochrome b6 f complex iron sulfur subunit	Elektron transportu	8.1	23711	35.58	19	6	<i>Triticum aestivum</i>
21	11/6.61-6.91	Artma	CAD29478.1	Glutathione transferase F5	Savunma/Peroksidaz	5.7	23422	21.59	12	3	<i>Triticum aestivum</i>
22	11/6.61-6.91	Artma	ACM78035.1	Fructose bisphosphate aldolase	Metabolizma/Glikoliziz	5.8	41988	32.47	26	13	<i>Triticum aestivum</i>
23	11/6.61-6.91	Artma	PTTG_00442T0	Hypothetical protein 206 aa uncharacterized	Bilinmiyor	4.1	21402	18.04	11	2	<i>Puccinia triticina</i>
24	11/6.61-6.91	Artma	PGTG_22158T0	Hypothetical protein 81 aa	Bilinmiyor	9.6	8753	38.75	10	3	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>
25	11/6.61-6.91	Artma	PGTG_16372T0	Hypothetical protein 164 aa	Bilinmiyor	9.6	18388	17.79	20	4	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>
26	11/6.61-6.91	Artma	AAF64241.1	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase GAPDH	Metabolizma/Karbohidrat	7.9	25276	29.78	21	5	<i>Triticum aestivum</i>
27	11/6.61-6.91	Artma	AAP7009.1	Cytosolic malate dehydrogenase	Metabolizma/Karbohidrat	6.6	24331	30.83	17	4	<i>Triticum aestivum</i>
28	11/6.61-6.91	Artma	AF479036_1	Formate dehydrogenase	Metabolizma	8.5	28993	33.45	19	5	<i>Triticum aestivum</i>
29	11/6.61-6.91	Artma	EGP88912.1	Hypothetical protein	Bilinmiyor	6.4	42376	26.50	33	5	<i>Mycospha.graminicola</i>
30	11/6.61-6.91	Artma	AAC62115.1	Manganese superoxide dismutase	Savunma/Antioksidan	7.0	24548	40.17	14	6	<i>Triticum aestivum</i>
31	11/6.61-6.91	Artma	EAT81933.1	Hypothetical protein SNOG 10539	Bilinmiyor	4.6	12805	28.57	21	3	<i>Phaeospha. nodorum</i>
32	11/6.61-6.91	Artma	AAW78582.1	Quinone reductase 2	Transkripsiyon/Negatif regülatör	5.9	21735	42.36	11	6	<i>Triticum monococcum</i>
33	11/6.61-6.91	Artma	EAT79784.1	Hypothetical protein SNOG 12984	Bilinmiyor	4.3	13437	32.8	8	1	<i>Phaeospha. nodorum</i>
34	11/6.61-6.91	Artma	XP-001937792.1	DNAJ domain containing protein	Sinyal İletimi/Moleküler şaperon	6.1	10513	28.12	8	2	<i>Pyrenoph. tritici-repentis</i>
35	11/6.61-6.91	Artma	PTTG_04614T0	Hypothetical protein 175 aa-	Bilinmiyor	9.1	19436	27.0	20	4	<i>Puccinia triticina</i>

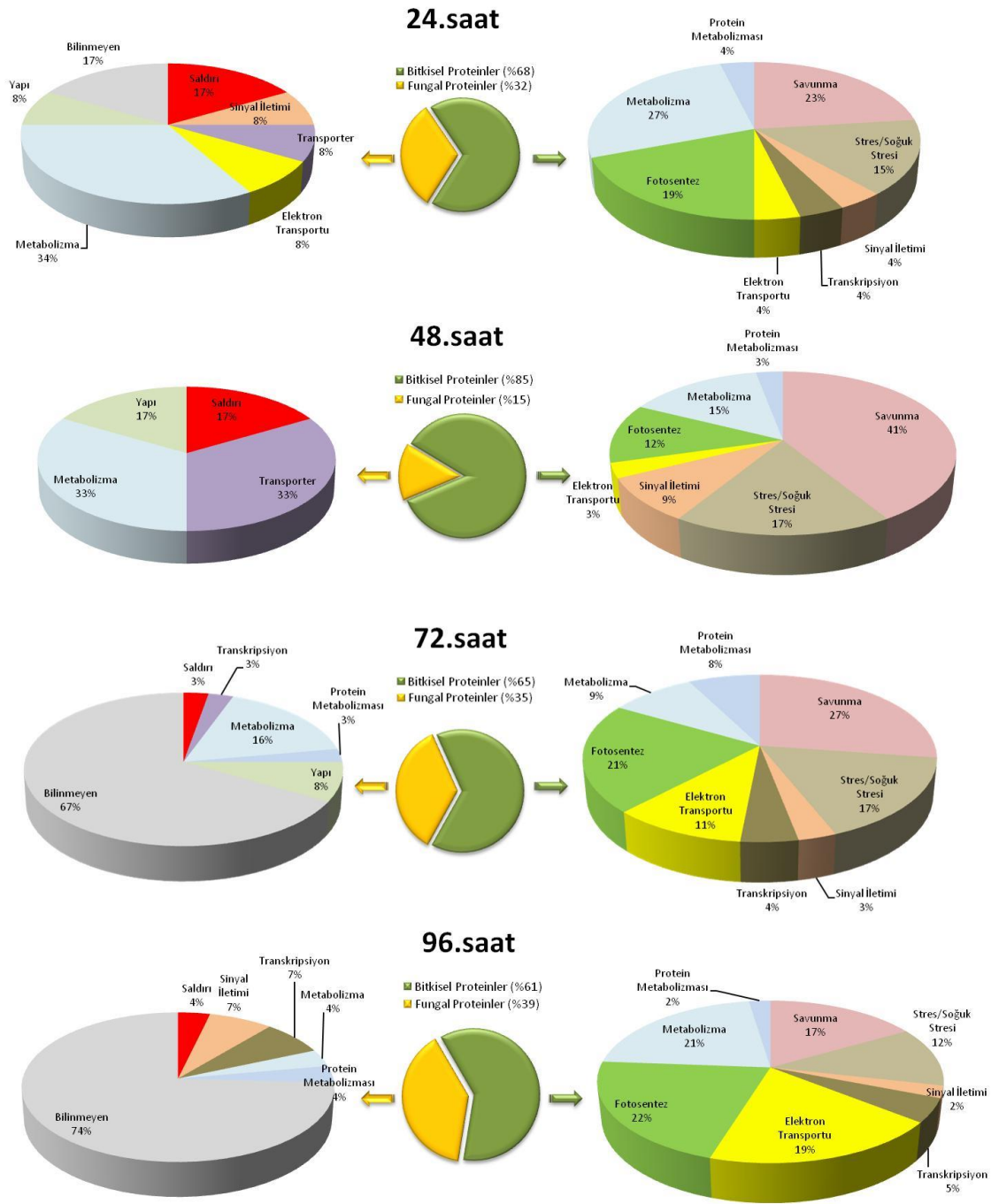
Çizelge 3.4'ün Devamı Doksanaltıncı saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accesion No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
36	12/6.91-7.21	Artma	PGTG_13068T0	Polyubiquitin A 610 aa	Protein metabolizması	7.7	68143	31.52	55	32	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>
37	12/6.91-7.21	Artma	EGP85370.1	ELP3 histone acetyltransferase	Metabolizma	7.9	62500	7.45	52	4	<i>Mycospha.graminicola</i>
38	13/7.21-7.51	Azalma	BAB47063.1	Cytochrome B6	Elektron transportu	9.0	24150	15.81	13	2	<i>Triticum aestivum</i>
39	13/7.21-7.51	Azalma	XP-003562323.1	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic-like	Fotosentez	4.6	24736	51.96	10	6	<i>Brachypodium distachyon</i>
40	13/7.21-7.51	Artma	PTTG_09358T0	Hypothetical protein 133 aa	Bilinmiyor	5.4	14862	22.55	16	3	<i>Puccinia triticina</i>
41	13/7.21-7.51	Artma	EAT82008.1	Hypothetical protein SNOG 10614	Bilinmiyor	6.9	61807	17.61	57	7	<i>Phaeospha. nodorum SN15</i>
42	21/8.45-8.50	Azalma	NP_114267.1	RuBisCo oxygenase large subunit	Fotosentez/Calvin cycle	6.2	52817	37.52	42	25	<i>Triticum aestivum</i>
43	21/8.45-8.50	Azalma	CAA40669.1	23kDa oxygen evolving protein of photosystem II	Fotosentez	9.0	27252	55.03	21	12	<i>Triticum aestivum</i>
44	21/8.45-8.50	Azalma	P12782.1	Phosphoglycerate kinase	Metabolizma/Karbohidrat	6.6	49808	20.41	44	7	<i>Triticum aestivum</i>
45	21/8.45-8.50	Azalma	ABO70330.1	Putative oxygen evolving complex precursor	Fotosentez	10.1	21126	45.68	19	9	<i>Triticum aestivum</i>
46	21/8.45-8.50	Azalma	NP_114266.1	ATP synthase CF1 beta subunit	Elektron transportu	4.8	53823	39.75	36	13	<i>Triticum aestivum</i>
47	21/8.45-8.50	Azalma	BAB47031.1	ATPase alpha subunit	Elektron transportu	6.0	55261	19.24	34	10	<i>Triticum aestivum</i>
48	21/8.45-8.50	Azalma	CAG25595.1	Putative RuBisCo small subunit	Fotosentez/Calvin cycle	8.4	19037	31.17	18	6	<i>Triticum durum</i>
49	21/8.45-8.50	Artma	PTTG_00002T0	Hypothetical protein 107 aa	Bilinmiyor	5.2	11478	33.01	3	2	<i>Puccinia triticina</i>
50	21/8.45-8.50	Artma	PGTG_20129T0	Hypothetical protein 106 aa	Bilinmiyor	11.5	11365	22.85	8	2	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>
51	21/8.45-8.50	Artma	AF475124_1	Glutathione peroxidase like protein	Savunma/Peroksidaz	9.3	13226	10.08	9	1	<i>Triticum aestivum</i>
52	22/>8.50	Artma	PTTG_07575T0	Hypothetical protein 366 aa	Bilinmiyor	11.7	40283	8.49	33	2	<i>Puccinia triticina</i>
53	22/>8.50	Artma	PTTG_03594T0	MAPK protein kinase 329 aa	Sinyal iletimi	6.4	37502	28.65	21	3	<i>Puccinia triticina</i>
54	22/>8.50	Artma	PGTG_10191T0	Hypothetical protein 211 aa	Bilinmiyor	9.6	23215	29.04	14	3	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>

Çizelge 3.4'ün Devamı Doksanaltıncı saat örneklerde tanımlanan proteinler

No	Frak. no/pH	Eksp. Farkı	Accesion No	Protein Tanımı	Görevi	Teorik pl	MA (Da)	S.Cover. (%)	Teorik peptid	Eşleşen peptid	Organizma
55	22/>8.50	Artma	PGTG_16792T0	Hypothetical protein 843 aa	Bilinmiyor	5.4	94045	7.36	77	6	<i>Pucc. graminis f sp tritici</i>
56	22/>8.50	Azalma	ABI96906.1	Chloroplast RuBisCo activase	Fotosentez	6.5	40034	15.0	30	4	<i>Triticum aestivum</i>
57	22/>8.50	Artma	ACV89491.1	Dehydroascorbate reductase (DHAR)	Savunma/Antioksidan	5.8	23343	46.69	18	8	<i>Triticum aestivum</i>
58	22/>8.50	Artma	AAM88439.1	Putative Rieske Fe S precursor protein	Elektron transportu	8.1	23711	33.78	19	5	<i>Triticum aestivum</i>
59	22/>8.50	Artma	ZP_07775686.1	Sigma 54 dependent DNA binding response regulator	Transkripsiyon	4.8	18491	38.27	12	2	<i>Pseudom. fluorescens</i>
60	22/>8.50	Artma	XP_003853918.1	Hypothetical protein MYCGRDRAFT_70050	Bilinmiyor	10.1	14981	8.95	14	1	<i>Zymoseptoria tritici IPO323</i>
61	22/>8.50	Artma	EFQ63896.1	Isochorismatase hydrolase	Saldırı	5.2	16605	19.73	8	2	<i>Pseudom. fluorescens</i>
62	22/>8.50	Artma	EAT88343.1	Hypothetical protein SNOG 04583	Bilinmiyor	4.6	7442	41.79	7	2	<i>Phaeospha. nodorum</i>
63	22/>8.50	Artma	PTTG_07784T0	Hypothetical protein 414 aa	Bilinmiyor	6.2	45346	22.51	27	4	<i>Puccinia triticina</i>
64	22/>8.50	Artma	ACE82289.1	Glutathione transferase	Savunma/Peroksidaz	6.3	24995	51.80	17	15	<i>Triticum aestivum</i>
65	23/>8.50	Azalma	CBH32512.1	Sedoheptulose 1 7 bisphosphatase	Metabolizma	6.1	42067	43.0	29	15	<i>Triticum aestivum</i>
66	23/>8.50	Artma	BAB18766.1	Cysteine proteinase inhibitör	Protein metabolizması/ Proteaz inhibitör	7.31	11780	64.48	10	7	<i>Triticum aestivum</i>
67	23/>8.50	Azalma	CAD30024.2	Ferredoxin NADP H oxidoreductase	Elektron transportu	8.12	38781	42.49	33	15	<i>Triticum aestivum</i>
68	23/>8.50	Artma	CAA53626.1	Endochitinase	Savunma	7.21	33580	38.75	15	10	<i>Triticum aestivum</i>
69	23/>8.50	Artma	XP_003578745.1	Adenylate kinase A-like	Metabolizma /Nükleik asit	7.21	26207	30.29	25	6	<i>Brachypodium distachyon</i>
70	24/>8.50	Artma	CAA07473.1	Pathogenesis related protein 1 1	Savunma	8.50	17639	37.19	12	5	<i>Triticum aestivum</i>

Yapılan analizler sonucunda inokulasyondan sonraki 24, 48, 72 ve 96. saatlerde patojenle inoküle edilen bitki dokularında kontrole göre farklı düzeyde eksprese edilen 193 protein tanımlandı ve bu proteinlerin %30'unun patojen kaynaklı olduğu belirlendi. Tanımlanan bitkisel proteinler, rol aldıkları biyolojik olaylar göz önünde bulundurularak 8 grupta (savunma, stres, sinyal iletimi, transkripsiyon, elektron transportu, fotosentez, metabolizma, protein metabolizması) sınıflandırıldı. Fungal proteinler ise fonksiyonlarına göre 9 grupta (saldırı, sinyal iletimi, transkripsiyon, transporter, elektron transportu, metabolizma, protein metabolizması, yapı, bilinmeyen) sınıflandırıldı (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 Tanımlanan bitkisel ve fungal proteinlerin her bir zaman dilimindeki dağılımları ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılması

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sarı pas hastalığı, dünya genelinde yayılım gösteren ve buğdayda ciddi verim kayıplarına neden olan bir hastalıktır. Bu nedenle tüm dünyada bir yandan klasik tarımsal yöntemlerle mücadele sürdürülürken, bir yandan da bitki ve patojene ait genetik ve moleküler veriler ortaya konmaya çalışılmaktadır. Bu yöndeki çalışmaların önemli bir kısmını bitkinin patojene karşı geliştirdiği hücresel cevabın moleküler düzeyde aydınlatılması yönündeki genomik ve transkriptomik çalışmalar oluşturmaktadır [86], [107], [108], [109], [110], [111], [112], [113], [114]. Bilindiği üzere bir biyolojik sistemde, herhangi bir durum karşısında ortaya konan hücresel cevap, sayısız proteinin katılımı ve etkileşimi ile şekillenir. Dolayısıyla bu tür araştırmalarda protein düzeyindeki bilgilerin ortaya konması, özellikle de bu mekanizmaların kritik noktalarında görev alan proteinlerin belirlenmesi daha somut sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu nedenle son yıllarda bitki-patojen etkileşimi gibi son derece karmaşık olan biyolojik süreçlerin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında proteomik yaklaşımlar oldukça etkin biçimde kullanılmaktadır. Ancak literatürde buğdayda sarı pas hastalığına hassasiyet mekanizmasının proteomik düzeyde incelendiği araştırma sayısı yok denecek kadar azdır. Sunulan tez çalışması, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* fungusunun buğdayda neden olduğu sarı pas hastalığına karşı bitkinin ortaya koyduğu moleküler cevabın ve hastalık gelişimi sırasında hem bitki hem de patojende meydana gelen proteom düzeyindeki değişimlerin incelendiği bir proteomik çalışmadır. Bu çalışma 1995 yılına kadar yaygın olarak ekimi yapılan ve ülkemizde bulunan sarı pas patotiplerine karşı hassas, kışlık, ekmeklik buğday çeşidi Seri82'de gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin, bitki-patojen etkileşiminde etkin rol alan gen/gen ürünlerini ortaya koymasının yanı sıra, sarı pas

hastalığına karşı mücadele de daha etkin ve hızlı çözümler üretilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

Tez çalışmasında, patojenle inoküle edilmiş (enfekte) ve boş inokülasyon yapılmış (kontrol) bitkilerde inokülasyonu takip eden 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan yaprak örnekleri bitki materyali olarak kullanılmıştır. Bu örneklerden ekstrakte edilen total protein örnekleri, PF2D sisteminde iki boyutlu ayrılarak fraksiyonlanmış ve iki boyutlu sanal jel haritaları oluşturularak her bir örnek için protein profilleri elde edilmiştir. Her bir zaman diliminde enfekte ve kontrol protein profilleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Kontrole göre anlatım düzeyi farklı olan proteinler MS analizleri ile tanımlanmıştır. Yapılan çalışmaların tamamı 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında 24, 48, 72 ve 96. saat örneklerde sırasıyla 12, 6, 36 ve 27 adet fungal protein tanımlanırken, 26, 34, 66 ve 42 adet bitkisel protein tanımlanmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3, Çizelge 3.4) ve rol aldıkları biyolojik süreçler göz önünde tutularak temel fonksiyonel gruplar altında sınıflandırılmışlardır (Şekil 3.18). Tablo ve grafiklerden de görüldüğü gibi 24 ve 48. saat örneklerde tanımlanan fungal proteinlerin sayısı patojenin bitkiyi istilasına paralel olarak 72 ve 96. saat örneklerde artmaktadır. Ancak bu proteinlerin önemli bir kısmını fonksiyonu bilinmeyen hypothetical proteinler oluşturmaktadır. Bunun en önemli nedeni, *Pst* genom dizileme çalışmasının veri analizi kısmının halen devam etmekte olmasıdır. Dolayısıyla bu çalışmada tanımlanan fungal proteinlerin çoğu bugüne kadar çalışılmış bakteri ve funguslara ait proteinlerle olan yüksek homolojilerine dayanmaktadır. Son olarak literatürde bulunan bitki-patojen ilişkisine dair bilgilerden de yararlanılarak tanımlanan proteinlerin, hastalık gelişimi sırasında buğday-*Pst* etkileşimindeki işlevleri açıklanmaya çalışılmıştır. Tezin bu kısımda tanımlanan proteinlerin buğday-*Pst* etkileşimindeki olası işlevleri, rol aldıkları fonksiyonel gruplar bazında tartışılmıştır.

Saldırı-Savunma Grubu Proteinler

Bitkiler, oldukça etkin olan kalıtsal bağışıklığı sayesinde çoğu patojene karşı dayanıklıdır. Dolayısıyla bir bitki bir patojenle karşılaştığında son derece koordineli bir dizi moleküler, hücresel ve dokuya dayalı savunma bariyerleri ile patojene karşı koyar. Bununla birlikte sürekli hayatta kalabilme mücadelesinin doğal bir sonucu olarak

evrimleşmeye devam eden tüm canlılar gibi patojen mikro-organizmalarda geliştirdikleri stratejilerle bu bariyerleri aşmanın yollarını aramaktadır. Bitki savunma sisteminden kaçmak, baskılamak veya bitkinin ürettiği antibiyotik ve antifungal bileşikleri detoksifiye etmek gibi savunma cevaplarını etkisiz kılacak karşı reaksiyonlar bu stratejiler arasında en genel olanlarıdır.

Bitki-patojen etkileşimindeki ilk aşama ve aynı zamanda bitkinin başarılı bir dayanıklılık cevabı geliştirebilmesindeki en kritik unsur bitkinin patojeni algılaması/tanımasıdır. Patojenin bitki tarafından nasıl tanındığı tüm ayrıntılarıyla bilinmemekle birlikte genel olarak elisitör özelliği gösteren lipopolisakkaritler, kitinler, glukanlar ve flagellinler gibi patojenle ilişkili moleküler motiflerin (MAMPs, PAMP) bitki yüzeyindeki reseptörlerce (PRR) algılanarak savunma sistemini aktive ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir [115]. Çoğu PAMP/MAMP'lar mikroorganizma için vazgeçilmez metabolizma elemanları olmakla birlikte konukçuya giriş ve saldırı için de gereklidirler ve bitkilerin potansiyel patojenleri tanımalarını sağlayan bir takım yapı veya motifler içermektedirler. Bu yapılar oldukça iyi korunmuştur ve bitki tarafından tanındığında bitkide ilk savunma adımı olan bazal savunma sistemi (PTI)'ni harekete geçirilir. Hücrelerde, plazma membranı boyunca hızlı iyon akışını da içeren PTI'de, başlıca MAP kinaz aktivitesi ile hücre içi sinyal iletiminin aktifleştirilmesi, hızlı ve yoğun biçimde ROS'ların üretimi, gen ekspresyonundaki hızlı değişimler ve hücre duvarının güçlendirilmesi reaksiyonları devreye girer. Hastalık yapma yetisindeki patojenler, çoğu salgı proteini olan virülens özellikteki efektör (Avr) proteinleri ile PTI'yi baskılama yeteneğindedir. Bitkide ise efektör proteinin etkisini ortadan kaldırmak üzere her bir Avr proteinine spesifik ve bu proteinleri tanıyarak daha spesifik ve güçlü bir dayanıklılık cevabı başlatacak (ETI) dayanıklılık (R) proteinleri evrimleşmiştir. ETI olarak isimlendirilen bu bağışıklık cevabı genellikle HR ile karakterizedir. Patojen ise ETI'yi baskılamak için yeni efektörler geliştirir ve böylece konukçu ile patojen arasındaki mücadele bitkide dayanıklılık veya hastalık gelişimi şeklinde sonuçlanır.

Tez çalışması kapsamında, yukarda özetlenen patojen ve bitkinin karşılıklı saldırı ve savunmasını takip eden olaylarda rol alan veya alabileceği öngörülen proteinler Tablo 4.1' de sunulmuştur. Buna göre 24. saat örneklerde tanımlanan patojene ait proteinlerden ikisinin patojenin bitki hücrelerine girişi ile ilişkili olabileceği öngörülmüş

ve “saldırı” grubu proteinler arasında sınıflandırılmıştır. Bunlardan biri yüksek oranda *Pseudomonas fluorescens*’e ait Methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs)’e homoloji göstermiştir. MCP’ler bakteri ve arkealarda bulunan, çeşitli kimyasal uyarılara karşı en iyi bilinen kemotaksis reseptörleridir. Karşılaşılan organizmaların besin gibi çekici ve toksin gibi uzaklaştırıcı moleküllerini tanır ve ekstraselüler matrikste bu moleküllerin yoğunluklarına bağlı olarak bakterinin yaklaşma veya uzaklaşma şeklinde hareket etmesini sağlar [116]. Saldırı sınıfında değerlendirilen bir diğer protein, yine *Pseudomonas fluorescens*’e ait Flagellar protein FliO/FliZ’e yüksek homoloji göstermiştir. FliO/FliZ proteini flagella biosentez proteini olarak da ifade edilmektedir. Bakteriler, kemotaksis gibi hareket gerektiren durumlarda flagellaları yardımıyla ileri-geri veya dönme şeklinde hareket ederler. Flagellar yapı proteinleri, stoplazmadan ayrı, yüksek seviyede korunaklı salgı sistemi yoluyla hücre yüzeyine taşınır ve gelişmekte olan flagella yapısına katılırlar. Bakterilerde flagella aracılığıyla gerçekleşen hareketin bazı patojenik bakteri türlerinin virülensliğine katkı sağladığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [117]. Örneğin bazı flagellin proteinleri adhezin gibi davranıp, flagellanın konukçu ligantı ile direkt etkileşime girerek kolonizasyonu kolaylaştırmasında fonksiyoneldir [118], [119]. Buna rağmen kesin patojenesis için mutlaka aktif hareketlilik gerekmektedir. Flagellar hareketin konukçu hücre istilasını arttırdığını destekleyen çalışmalar da mevcuttur [119], [120]. Ancak genel olarak bu yapının tüm fonksiyonlarının bilinmediği söylenebilir. FliO/FliZ membran bütünleyici bir proteindir, flagella biyosentezinde yer alır fakat moleküler fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir [121]. Fungal patojenlerle yapılan çalışmalarda daha önce bu proteinlere benzer proteine rastlanmamıştır. Çalışmamızda tanımlanan MCP’ye homoloji gösteren proteinin patojenin bitki yüzeyine tutunma, FliO/FliZ’e homoloji gösteren proteinin ise hücre içine giriş yapabileceği bir açıklık bulamak üzere *Pst* sporlarından gelişen flagellaların sentezinden sorumlu olabileceğini ve bu nedenle ekspresyonunun artmış olabileceği düşünülmektedir.

24. saat örneklerde kontrole göre artış yönünde ekspresyon farkı gözlenen bitkisel proteinler arasında ise, savunma yanıtının iki önemli elemanı olan superoxide dismutases (SOD) ve Flavanone 3 hydroxylase (F3H) tanımlanmıştır. Patojen saldırılarına karşı ilk savunma yanıtlarından biri olan oksidatif patlama yüksek

miktarlarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) hızlı biçimde üretimi ile karakterizedir [122]. Bu süreçte, bitki hücrelerinde, plazma membranında bulunan NADPH oksidaz, hücre duvarına bağlı peroksidazlar ve amin oksidazların aktivitesindeki artışla bol miktarda ROS [süperoksitler ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikalleri ($HO\bullet$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)] üretilir. Bitki dışındaki $O_2^{\cdot-}$ 'ler, SOD enzimleri aracılığıyla genellikle hızlı bir biçimde plazma membranından geçebilecek özellikte olan H_2O_2 'ye dönüştürülür. H_2O_2 hücrelerde katalaz, askorbat peroksidaz ya da glutatyon peroksidaz enzimleri ile suya dönüştürülerek zararsız hale getirilir. 24. Saat örneklerde hem sitoplazmik ve mitokondriyal hem de kloroplastik SOD'lar (Çizelge 4.1) tanımlanmıştır ancak peroksidaz ve GSH enzimleri daha sonraki zaman dilimlerinde gözlenmiştir.

ROS'ların bitki savunma sisteminde birden fazla rolü vardır. Birincil olarak ROS'lar doğrudan patojen için toksik özellik gösterebilmektedir. Yapılan çalışmalarda hücrelere H_2O_2 eklenmesinin fungal patojenlerde spor gelişimini inhibe ettiği ortaya konulmuştur. Bu çalışmalar sonucunda oksidatif patlamanın savunma mekanizmasındaki en önemli etkilerinin patojenin ölümüne yol açmak veya gelişimini engelleyerek yayılımını durdurmak olduğu belirlenmiştir [123].

ROS'lar ayrıca diğer savunma cevabı olan membran kalınlaşmasında ve buna bağlı olarak bazı maddelerin birikiminde de rolleri vardır. H_2O_2 etkisi ile patojenin bitki hücre duvarına tutunmasına ve duvarın patojen kaynaklı enzimler ile parçalanmasına karşı dayanıklı kılmak üzere, çeşitli modifikasyonlar olmaktadır. Burada amaç bitkinin ilk transkripsiyonel savunma cevabı oluşana kadar patojeni yavaşlatmak ve HR sonucu ölen bitki hücrelerinde hapsetmektir. Oksidatif patlamanın savunma mekanizmasındaki bir başka görevi, savunma sinyal yollarında rol alarak bir takım genlerin ekspresyonunu aktive etmektir. Örneğin H_2O_2 , SA biyosentezi için gerekli olan benzoik asit 2-hidroksilaz (BA 2-H) enzim aktivitesini indükler. Ayrıca ROS'ların hızlı biçimde ve yüksek miktarda üretimi savunma yanıtı veren hücrelerdeki redoks dengesini önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Redoksla-düzenlenen memeli transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi, spesifik bitki transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi de hücrelerin redoks durumunun değişimiyle düzenlenmektedir. Örneğin, fungal elisitöre karşı savunma cevabı oluşumu için soya hücrelerine dış kaynaklı H_2O_2 eklenmesi ile phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ve chalcone synthase (CHS) transkriptlerinde düşük seviyeli

birikim gözlenirken, GST, glutathione peroxidase ve polyubiquitin mRNA miktarlarında hızlı artışlar belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 Tanımlanan saldırı ve savunma grubu proteinler ve ekspresyon farklılıkları

	SAVUNMA_SALDIRI GRUBU PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
FUNGAL	Methyl accepting chemotaxis protein	√							
	Flagellar protein FlhO FlhZ	√							
	Endoxylanase Precursor			√					
	Isochorismatase hydrolase					√		√	
BİTKİSEL	Flavanone 3 hydroxylase	√							
	Thylakoid Bound Ascorbate Peroxidase			√					
	Lipid Transfer Protein Precursor/PR14			√					
	Peroxiredoxin Q			√		√			
	Superoxide Dismutase (SOD)			√					
	Chloroplast Cu Zn SOD	√		√					
	Cytosolic Cu Zn SOD	√		√					
	Manganese SOD	√		√		√		√	
	Mitochondrial SOD	√							
	Metacaspase 4				√				
	Agmatine Coumaroyl Transferase			√					
	Catalase			√		√			
	Glutathione S Transferase 19E50			√		√			
	Thiol Specific Antioxidant Protein			√					
	Peroxidase 8			√					
	Rust resistance kinase Lr10			√					
	Resistance related receptor like kinase					√			
	PR 4					√			
	Pathogenesis related protein 1 3					√			
	Class III peroxidase					√			
	Ascorbate peroxidase					√			
	Glutathione transferase					√		√	
	Endochitinase					√		√	
	Chitinase 1					√			
	Lipid transfer protein precursor/PR14					√			
	Type 1 non specific LTP /PR14					√			
	Sulfur rich thionin like protein/PR13					√			
	Pathogenesis related protein 1 2					√			
	Pathogenesis related protein 1 1					√		√	
	Pathogenesis related protein 1 4					√			
	Glutathione transferase F5							√	
	Glutathione peroxidase like protein							√	
	Dehydroascorbate reductase (DHAR)	√						√	

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hastalık yapabilen patojenlerin, konakları tarafından üretilen toksik etkili bu ROS'lerden kurtulmasının başarılı bir enfeksiyon için esas olduğu ortaya konmuştur [124]. Baklada pas fungusu *Uromyces fabae* ile yapılan çalışmada patojenin, enfeksiyon sırasında konakçısından sağladığı karbohidratları C6-polyol mannitol'e çevirdiği ve mannitolün de ROS'ların temizlenmesinde önemli rolü olduğu ortaya konmuştur. Çalışmada biotrofik ve hemibiotrofik fungusların enfeksiyon oluşturabilmesinin, bitki ile etkileşiminin ilk aşamasında ya tamamen PTI'yi baskılayarak ya da ROS'ları temizleyerek oksidatif patlamanın ve HR'ın etkilerinden korunmasına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır [125]. Diğer yandan patojen de bitki gibi ROS'lerden yararlanarak yayılma ve hastalık oluşturma yeteneğini artırmaktadır. Son yıllarda bitki-patojen etkileşimini patojen yönünde inceleyen çalışmalarda ROS oluşturan NADPH oxidases (NOx) enziminin, patojenisite gelişiminde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir ve üretilen ROS'ların apresoryum oluşumu ile doğrudan ilişkili olduğu ortaya konmuştur [126], [127]. *M. grisea*'a ile çeltikte yapılan çalışmada ROS'ların temizlenmesinin [127] ve *Claviceps purpurea* ile delice otunda yapılan çalışmada olduğu gibi NOx enziminin susturulması ile hastalık gelişiminin önemli ölçüde engellendiği gözlenmiştir [126]. Ayrıca *B. cinerea* ile domates bitkisinde yapılan çalışmada da, enfeksiyon sırasında patojenden gelişen hiflerin uçlarında O^{-2} birikiminin olduğu buna ilave olarak da patojenin nüfuz ettiği hücrelerin etrafında bol miktarda H_2O_2 üretildiği belirlenmiştir [128].

Dolayısıyla tez çalışmasında 24. saat örneklerde tanımlanan gerek sitoplazmik, gerekse kloroplast ve mitokondrial SOD enzimleri (Çizelge 4.1) buğday-*Pst* etkileşiminin erken evresinde bol miktarda ROS üretimi olduğunu ortaya koymaktadır. ROS'ların kaynağının bitki kadar patojen de olabileceği ama her iki durumda da bitkinin kendini korumak üzere SOD'ların ekspresyonunu arttırdığı düşünülmektedir. Bu zaman diliminde SOD'lar dışında antioksidan bir enzim olan Dehydroascorbate reductase (DHAR)'ında ekspresyonu artmıştır. 48. saat örneklerde SOD'ların yanı sıra katalaz ve peroksidazların da (PRXQ, CAT, GST, PRX8) ekspresyonu artarken 72 ve 96. saat örneklerde sadece katalaz ve peroksidazların varlığı dikkat çekmektedir (Çizelge 4.1). Bu durum, *Pst* istilası arttıkça bitkinin patojenle başa çıkmak üzere O^{-2} üretmek yerine hif gibi gelişen patojenik yapılarında üretilen O^{-2} 'lerin toksik etkisinden korunmak üzere

daha çok katalaz ve peroksidaz enzimlerini (PRXQ, CAT, GST, TSA, POX, APOX, GT, GST-F5, GPX) sentezlemiş olabileceğini düşündürmektedir.

24. saat örneklerde tanımlanan bir diğer savunma grubu protein “Phenylpropanoid biyosentez yolağı”nın önemli enzimlerinden F3H’dür. Phenylpropanoidler bitkilerde birçok biyotik ve abiyotik stres tarafından uyarılan bileşiklerdir ve “phytoalexin” olarak isimlendirilirler. Çoğu antimikrobiyal veya antifungal özellikteki bu bileşikler arasında pterocarpanlar (glyceollin), isoflavanlar, prenylated isoflavonoidler (kievitone), stilbenler, psoralenler, coumarinler, 3-deoxyanthocyanidinler, flavonollar (quercetin, kaempferol) ve auronlar yer almaktadır. Genellikle bitkinin patojenle karşılaşmasının ardında gelişen erken reaksiyonlardan biridir ve enfekte bölgelerde yoğun biçimde sentezleri artar [129]. Flavonoid yolağı phenylpropanoid biyosentezinin önemli kollarından biridir ve patojen saldırıları sonucu üretilen phytoalexinlerin çoğu flavonoid yolağında sentezlenir. F3H enzimi de flavonoid yolağında görev alan kritik enzimlerden biridir. Bitki-patojen etkileşimi konulu birçok çalışmada phenylpropanoid yolağı geninin (O-methyltransferase (OMT), chalcone synthase (CHS) ve F3H) ekspresyonunda artış gözlenmiştir [130], [131], [132]. Hassas pirinç çeşidinde *Pyricularia oryzae* fungusu ile yapılan çalışmada bu yolağa ait PAL enziminin transkript seviyesinde arttığı rapor edilmiştir [133]. Yine muzda *Mycosphaerella fijiensis* fungusu ile yapılan çalışmada hastalık gelişimi sırasında CHS, F3H ve isoflavone reductase-like (IFR-like) enzim genlerinin indüklendiği gösterilmiştir [134].

24. saat örneklerde elde edilen sonuçlar, buğdayda, *Pst* saldırısına karşı yoğun bir oksidatif patlama ve antifungal phytoalexinlerin sentezinin ilk savunma cevabı olarak ortaya çıktığını göstermektedir. Buna karşılık 48. saat örneklerde tanımlanan fungal proteinlerden biri olan “Endoxylanase Precursor” patojenin saldırısına devam ettiğini göstermektedir.

Hastalık oluşturabilen fungal patojenler, başarılı biçimde bitki yüzeyine tutunup hücre içine giriş yapmak üzere hareket ederler. Bitki yüzeyine tutunan fungal sporlarda çimlenme borusu büyür ve değişik yollarla konukçu hücre içerisine giriş yapar. Bu aşamada, bazı patojenler özelleşmiş yapılar aracılığı ile bitki dokusunda açıklık oluşturmaya çalışırken bazı patojenler bitki dokusuna giriş için hücre duvarı parçalayıcı

enzimlere (cell wall degradation enzymes-CWDE) ihtiyaç duyar. Bir başka grup patojen ise her iki yöntemi de kullanır. CWDE enzimleri bitki hücre duvarı içeriğinin bütünlüğünü bozarak enfeksiyon için giriş kapısı oluşturur. Bu enzim grubu, arasında hemiselülozu parçalayan “xylanase”, pektin polimerlerini sindiren “exopolygalakturonase” ve “pectin methyl esterase”, selülozda etkin “endoglucanase” ve polisakkarit bileşiklerindeki asetil gruplarını temizleyen “polysaccharide deacetylase”lardan ibarettir. Bitki hücre duvarını oluşturan bileşenler genel olarak aynı olmakla birlikte tahıl hücre duvarı matrikslerinde büyük oranda arabinoksilanlar yer almaktadırlar ve tahıl patojenlerinin saldırı mekanizmasında arabinoksilan parçalayıcı enzimler önemli bir yere sahiptir. Endoxylanase’lar (Endo-b-1,4-xylanases) arabinoksilan polimerlerinin bozunmasını sağlayan etkin bir enzimdir ve *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*)’un endoxylanasesi iyi çalışılmıştır [135]. Glycosyl hidrolase ailesinden olan endoxylanase, bitki hücre duvarını parçalamadaki etkinliğinin yanı sıra, özellikle fungal patojenlerde patojeniteyi artırıcı rolünden dolayı da önemlidir. Ayrıca bitkide savunma cevabını tetikleyici elisitör görevi yapmaktadır ve patojen saldırısında doğrudan etkilidir [136]. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ile yapılan çalışmada domates bitkisinde enfeksiyon süresince farklı anlatım yapan endoksilenaz genlerinin hastalık gelişiminde önemli rol oynadıkları ortaya konmuştur [137].

48. saat örneklerde tanımlanan bitkisel proteinlerden Metacaspase 4 (MCA4), Rust resistance kinase Lr10 (LRK10), Agmatine Coumaroyl Transferase (ACT) ve Lipid Transfer Protein (LTP) protein, savunma grubunda yer alan önemli proteinlerdir. Bunlardan sadece MCA4’ün ekspresyonunda azalma gözlenirken diğer savunma grubu proteinlerin ekspresyonu artmıştır.

Programlı hücre ölümü, organizmanın kendi oto-kontrolü ile istenmeyen veya zarar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılması amacıyla gerçekleştirilen bir hücre ölümü olayıdır [138]. İnsan ve hayvanlarda meydana gelen programlı hücre ölümü apoptoz olarak isimlendirilir ve temel proteazlar arasında yer alan kaspaz enzimleri bu süreçte önemli rol oynar [139], [140]. Bitkilerde programlı hücre ölümünün en bilinen örneği HR, patojen efektörlerinin tanınması ile bitkide uyarılan ETI’de ilk gelişen önemli reaksiyonlarından biridir. Patojenle enfekte hücrelerin yanı sıra komşu hücrelerde

meydana gelen HR, bitkiyi işgal eden patojeni besin kaynağından mahrum ederek gelişim ve yayılımını durdurmak amaçlı önemli ve etkin bir savunma yanıtıdır. Çeşitli bitkilerde farklı patojenlerle gerçekleştirilen çalışmalarda kaspaz sınıfı sistein-proteazlardan olan MCA4'ün HR'la olan ilişkisi ayrıntılı biçimde incelenmiştir. *Arabidopsis*'te patojen dayanıklılığı ile ilişkili birbirinden farklı bir kaç MCA tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda oluşturulan çok sayıda farklı MCA mutantlarında, nekrotrofik fungus-*Botrytis* ırklarına karşı hassasiyette önemli farklılıklar gözlenmiştir [141]. Tanımlanan MCA'dan, *AtMCA1*'in pozitif düzenleyici, *AtMCA2*'nin ise negatif düzenleyici olarak HR'u antagonistik biçimde kontrol ettikleri rapor edilmiştir [142]. Bir başka çalışma da *AtMCA4*'ün hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarında uyarılan HR için pozitif aracı rolü oynadığı belirlenmiştir [143]. Buğday-*Pst* etkileşiminde MCA4'ün HR'daki rolüne dair Wang vd. tarafından yapılan çalışmada [88] i) *TaMCA4* geni tütüne transfer edilmiş ve geçici ekspresyonunun normal koşullarda yaprak dokusunda doğrudan programlı hücre ölümünü teşvik etmede başarısız olduğu ancak *Pst*'ye ait bir efektörün varlığında hücre ölümünü arttığı gösterilmiştir, ii) Ayrıca buğdayda VIGS (virus-induced gene silencing) yöntemi ile *TaMCA4* geni susturulmuş ve bu durumda bitkide avirulens *Pst*'ye karşı hassasiyetin arttığı, HR bölgelerinin azaldığı rapor edilmiştir. Elde edilen bu iki önemli bulgu, buğday-*Pst* etkileşimi sonucu uyarılan HR'da *TaMCA4*'un etkin bir rol oynadığını açıkça ortaya koymaktadır. Dolayısıyla tez çalışmasında 48. Saat örneklerde tanımlanan *TaMCA4*'un ekspresyonunun azalması, bitkinin savunmasında çok önemli olan HR'un beklenen etkinlikte meydana gelmediğinin bir kanıtıdır ve *TaMCA4* 'ün, buğdayda *Pst*'ye karşı geliştirilen savunma cevabının önemli elemanlarından biri olduğunu düşündürmektedir.

48. saat örneklerde ekspresyonu artan LRK10 protein, serin/treonin kinaz aktivitesine sahip bir bitki receptor-like kinase (RLK)'dır. Hücre yüzey reseptörlerince, çeşitli çevresel uyarıların algılanması tüm organizmaların en temel ortak özelliğidir. Bitkilerde farklı tipte birçok (buğdayda yaklaşık 20 grup) hücre yüzey reseptörü vardır ve bunlardan biri RLK'lardır. Bakteriyel ve fungal hastalık dayanıklılığı, gelişimin düzenlenmesi, hormon sinyallerinin algılanması ve yabancı madde/faktörlerin tanınması dahil bir çok biyolojik olaya katılır ve hücre içi sinyal iletiminin başlatılmasında önemli rol oynarlar [144], [145]. Ayrıca buğdayda yer alan LRK genleri

içerisinde en çok çalışılan LRK10 genidir, yaprak pası dayanıklılık lokusu (Lr10) ile gerek genetik gerekse fiziksel bağlantıya sahiptir. Ancak sarı pas dayanıklılığındaki rolü hakkında henüz net bir veri yoktur [146]. Bununla birlikte 72. Saat örneklerde ekspresyonu artan ve LRK-10 ile %83 benzerlik taşıyan aynı grup proteinlerden “Resistance related receptor like kinase (RLK-R3)”ın sarı pas dayanıklılığında etkin olduğu [147] tarafından yapılan çalışmada ortaya konmuştur. Bu çalışmada Suwon 11 buğday çeşidi virulent ve avirulent *Pst* ırkları ile inoküle edilmiş ve ardından 1, 3 ve 7. günlerde *TaRLK-R1*, 2 ve 3 genlerinin transkripsiyon seviyeleri belirlenmiştir. Buna göre 3. ve 7. günde hem uyumlu hem de uyumsuz etkileşimde, *TaRLK-R1*, 2 ve 3 genlerinin transkripsiyon seviyelerinin arttığı ancak dayanıklılıkta artış seviyesinin çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte dayanıklılıkta özellikle HR sırasında her üç gende gözlenen artışın son derece anlamlı olduğu da gözlenmiştir. Ayrıca bu genler VIGS yöntemi ile susturulduğunda elde edilen sonuçlar *TaRLK-R1*, 2 ve 3 genlerinin buğday-*Pst* etkileşimi sonucunda gelişen HR’da pozitif düzenleyici olduklarını göstermiştir.

48. saat örneklerde ekspresyonu artan bir diğer protein, Agmatine Coumaroyl Transferase (ACT), bitkilerde karakterize edilen ilk “N-hydroxycinnamoyltransferase”dır ve Hydroxycinnamic acid amide (HCAA) biyosentezinde görev alırlar. HCAA’ler patojen enfeksiyonuna yanıtta üretilen sekonder metabolitlerdendir ve antifungal bir bileşik olan hordatın’ın başlangıç maddesidir. Bitki patojen etkileşiminde HCAA’lerde artış gözlenmiştir. Örneğin, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* ile enfekte edilmiş arpa yapraklarında p-coumaroylagmatine (CouAgm) birikiminin indüklendiği görülmüştür [148]. Bir başka çalışma da avenanthramide’lerin *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*’nin hif uzantılarını baskıladığı belirtilmiştir [149]. Ayrıca HCAA’lar hücre duvarında birikme yoluyla da bitki savunmasına katkıda bulunurlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda HCAA sentezinin, buğday ve diğer tahıllarda fungal enfeksiyona karşı indüklediği ve yapraklarda birikim yaptığı rapor edilmiştir [148], [150].

Aynı örneklerde tanımlanan bir diğer savunma grubu protein Lipid transfer proteini (LTP2)’dir. Bu proteinler, yüksek bitkilerde fazlaca bulunur (total çözünebilen proteinlerin %4’ü) ve membranlar arasındaki fosfolipidlerin transferini sağlar. Temeldeki bu özelliklerinden dolayı membran biyosentezinde ve yağ asitlerinin düzenlenmesinde görev almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar LTP’lerin hücre

duvarlarında ve salgı yollarında da yer aldığını ortaya koymuştur. Bu bulgulardan yola çıkılarak, bitki LTP'lerinin asıl rollerinin kütin oluşumu, embriyogenesis, fitopatogenlere karşı savunma, simbiyosis ve değişken çevre koşullarına bitkilerin adaptasyonu olduğu savunulmaktadır. Bazı LTP'lerin antifungal ve antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu da belirlenmiştir [151] ve PR grubu proteinler arasında PR14 olarak sınıflandırılmıştır [152]. Ayrıca *Phytophthora* ve *Pythium* türü patojenler tarafından salgılanan ve bitkilerde savunma cevabını uyaran elicitin proteinlerinin, bitki LTP'leri ile yapısal olarak benzer proteinler olduğu belirlenmiştir [151]. Tez kapsamında 48. saat örneklerin yanı sıra 72 ve 96. saatlerde de LTP'nin ekspresyonunun artışı devam etmiştir. Ayrıca 72. saat örneklerde buna ek olarak aynı gruptan "Type 1 non specific lipid transfer protein (LTP9.7e)" ekspresyonunda da artış gözlenmiştir.

24 ve 48. saat örneklerde bitki savunması ile ilişkili olarak tanımlanan proteinler Seri82'de *Pst* saldırısına karşı yoğun biçimde ve çok yönlü bir savunma ile karşı konmaya çalışıldığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte 72 ve 96. saat örneklerde tanımlanan fungal "Isochorismatase hydrolase" enzimi, patojenin de bitki savunmasını baskılamak üzere saldırısına devam ettiğini göstermektedir. Çünkü bu enzim bitki savunma cevabının en önemli sinyal moleküllerinden olan SA'nin üretimini inhibe eder ve potansiyel bir bitki savunma baskılayıcısıdır [153]. Bitkilerde SA biyosentezi, fenilpropanoid ve isochorismate yolağında üretilir [154]. Isochorismatase, H₂O varlığında isochorismatı 2,3- dihydroxybenzoat ve piruvata çevirerek SA biyosentezini inhibe eder. Bu enzim ailesine ait motifler 5 farklı patojenik fungusa ait salgı proteinleri arasında bulunmasına rağmen patojenik olmayan filamentli funguslarda rastlanmamıştır [155]. Elde edilen sonuçlar son derece agresif olan patojenik funguslarda, isochorismatase hydrolase enzim üretiminin bitki savunmasından kurtulmak üzere arttırıldığı sonucunu doğurmuştur. Ayrıca SA üretimi inhibisyonunun bitki savunmasının baskılanmasındaki önemi farklı çalışmalarda da vurgulanmıştır [156]. Bu nedenle tez çalışmasında tanımlanan fungal isochorismatase hydrolase enziminin hastalık gelişiminde rol alan patojen kaynaklı kritik bir enzim olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda hastalık kontrolünde kullanılabilecek hedef enzim ve proteinler üzerinde yoğunlaşmaktadır ve daha önce yapılan çalışmalarda da bu enzimin uygun bir hedef olabileceği görüşü rapor edilmiştir [153].

72 ve 96. saat örneklerde tanımlanan bitkisel proteinlerden kitinaz ve endokitinaz enzimleri, önemli bitki savunma proteinlerindendir. Pek çok bitkisel kitinaz enzimi, endokitinaz grubuna dahildir ve fungus hücre duvarının %60'ını oluşturan temel yapı elemanı kitinin hidrolizini katalizler. Bitkilerde kitin sentezi olmaz, fungal saldırılar sonucunda kitinaz enziminin ekspresyonu indüklenir. Kitinin hidrolizi sonucunda ortaya çıkan kitooligosakkaridler gibi küçük kitin fragmentleri aynı zamanda bitki savunmasını uyaran genel elisitörler arasında yer almaktadır [157], [158]. Bu nedenle saflaştırılmış kitooligosakkaridler, bitkilerde pek çok savunma cevabını uyarmak ve dayanıklılığı artırmak üzere kullanılan elisitör bileşikler olarak çalışılmıştır [157], [159]. Saflaştırılmış endokitinaz enzimlerinin ise, hem *in vivo* hem de *in vitro* da, geniş spektrumlu antifungal aktivite göstererek pek çok fungal patojenin gelişimini durdurduğu rapor edilmiştir [160]. Bu nedenle fungal patojenlerin gelişiminin ve yayılımının durdurulmasında bitki savunmasının temel ve en önemli elemanları arasında yer alan kitinaz/endokitinazlar, PR protein grubunun 5 üyesini oluşturmaktadırlar (kitinaz-PR3, PR4 ve PR8; endokitinaz-PR11) [152]. 72 ve 96. saat örneklerde kitinaz ve endokitinazlar dışında kontrole göre ekspresyonu artan diğer PR proteinleri PR4, PR1.1, PR1.2, PR1.3 ve PR1.4'dür.

1980 yılında Antoniow vd. [161] tarafından, konak bitkide sadece patojenle bulaşmanın ardından veya benzer durumlarda eksprese olan proteinler olarak sınıflandırılarak isimlendirilen PR proteinleri, dizi benzerlikleri ile serolojik ve yapısal özelliklerinin yanı sıra fonksiyonel özellikleri de göz önünde bulundurularak sınıflandırılmışlardır [152]. Bunlar arasında tüm bitki türlerinde gözlenen ve yüksek oranda korunmuşluk gösteren PR1 grubu gen ailesi çok sayıda PR1 geni içerir. Tütünde 16, *Arabidopsis*'te 22 ve çeltikte 39, buğdayda ise 23 PR1 (PR1.1-PR1.23) geni bulunmaktadır [162]. Çok sayıda üyesi bulunan PR1 grubu proteinlerin, hem bitkide hem de *in vitro*'da antifungal özellik gösterdiği Niderman [163] tarafından rapor edilmiş olmakla birlikte, son yıllardaki yayınlarda fonksiyonunun tam olarak bilinmediği belirtilmektedir [152]. Bir başka görüş ise yüksek korunmuşluk gösteren moleküler yapıları nedeniyle bu proteinlerin son derece önemli bir veya birkaç fonksiyona sahip olabileceği şeklindedir [164]. Çalışmamızda aynı örneklerde tanımlanan bir diğer PR protein, PR4'dür. Buğday da tanımlanan PR4 proteinlerinin (wheatwin1,-2, -3, -4) patojenik fungus enfeksiyonlarının

ardından hızlı biçimde sentezlendiği ve patojen hif gelişimini güçlü biçimde inhibe ettiği belirlenmiştir [165], [166]. Ayrıca bir başka çalışmada bu proteinlerin çeşitli patojenlere karşı güçlü antifungal aktivite gösterdiği de belirlenmiştir [167]. Bununla birlikte tütünde tanımlanan PR4 proteini kitinaz grubu enzimlerdendir.

Bitki savunmasının en önemli karakteristik elemanları olan PR proteinleri, patojen saldırılarının ardından hızla eksprese edilirler. PR proteinlerinin ekspresyon profili farklı bitkilerde farklı patojenlere karşı değişiklik gösterir [168]. Ekspresyon artışları genellikle dayanıklılığı temsil etmekle birlikte çalışmamızda olduğu gibi farklı bitkilerde hassasiyet cevabında da gözlenmiştir [169]. Örneğin, *Arabidopsis*'te *Erysiphe graminis* fungusu ile yapılan çalışmada PR1.1 ve PR1.2'nin hem dayanıklı hem de hassas çeşitte ekspresyonunun arttığı gözlenmiş ancak hassasiyet cevabındaki artış oranının daha düşük olduğu tespit edilmiştir [170]. Buğdayda *Puccinia tiriticina* (yaprak pası) ile yapılan çalışmada da enfeksiyon gelişimi sırasında PR1.2'nin ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir [171]. Ayrıca buğdayda *Puccinia striiformis* ile yapılan bir başka çalışmada hassasiyet cevabında 24 ve 48. saatlerde PR2 ile PR4'ün transkript seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir [89]. Oysa erken evrede ekspresyonu artan PR1 ve PR4, literatürde bitkinin biyotrofik bir fungusla karşılaşmasının ardından geliştirilen güçlü sistemik kazanılmış dayanıklılığın (SAR) önemli bir göstergesi olarak tanımlanmaktadır [172]. Buna uygun olarak, TÜBİTAK MAM GMBE Bitki Gen Teknolojileri Laboaratuvarı tarafından sarı pasa dayanıklı çeşit İzgi2001'de gerçekleştirilen proteomik çalışmada 24. saat-erken dayanıklılık cevabında PR1 ve PR4'ün ekspresyonundaki artış ortaya konmuştur [173].

Stres Grubu Proteinler

Bitkiler doğal çevreleri içerisinde kendileri için stres oluşturabilecek çeşitli stres faktörleriyle bir aradadırlar. Bu stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmakla birlikte, gelişimini sürdüren bitki çoğunlukla her iki stres faktörüne birlikte maruz kalmaktadır. Bu elverişsiz koşulların üstesinden gelip yaşamlarını sürdürebilmek için biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı bir cevap veya adaptasyon için kompleks bir mekanizma geliştirirler [174]. Bu mekanizma kapsamında, bir patojen bitkiye saldırdığında birçok proteinin ekspresyonu değişerek farklı metabolik süreçler aktive

edilir. Tez çalışması kapsamında da savunma grubu proteinlerin dışında stres ile ilişkili çok sayıda “Cold responsive (COR)” veya “Late embryogenesis abundant (LEA)” proteinler olarak isimlendirilen proteinlerin ekspresyonunda artış belirlenmiştir. Bu proteinler Çizelge 4.2’de sunulmuştur. COR/LEA proteinler, bitki, alg, bakteri ve funguslarda bulunan, glisince zengin büyük bir hidrofilik protein ailesinin üyeleridir [175]. Genellikle kuraklık toleransında eksprese olurken çoğu LEA grubu proteinin ekspresyonu soğuk, ozmotik stres veya eksojen ABA uygulaması ile uyarılmaktadır [176]. Bu protein grubunun fonksiyonlarının ne olduğu çok açık değilse de çeşitli biotik ve abiotik stres toleransında işlevsel oldukları bilinmektedir [177], [178], [179]. Ayrıca bitkide patojenlere karşı dayanıklılığı artırdığını artaya koyan çalışmalarda vardır [180]. Singh vd. [181], LEA proteinlerinin fonksiyonunun, yaralanma veya kurumaya karşılık bitkinin sıvı kaybını durdurmak veya en aza indirmek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bazı diğer kanıtlar da bu proteinlerin hücrelerdeki sıvı kaybından kaynaklı hücre yapısının korunmasında rol aldıklarını ortaya koymaktadır [176].

Çizelge 4.2 Tanımlanan stres grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları

	BİTKİSEL PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
Stres / Soğuk Stresi	WCOR14c	√							
	Cold responsive LEA RAB related COR protein	√		√		√			
	Stress responsive protein	√							
	Heat Shock Protein 70			√					
	Wcor14a			√					√
	Cold Responsive Protein COR14a			√			√		√
	Wcor719			√					
	Group 3 LEA Protein		√	√		√		√	
	Cold acclimation protein WCS19					√			√
	Chloroplast targeted COR protein						√		√
	Cold responsive protein WCOR14						√		
	Cold acclimation protein WCOR615						√		
	Cold shock domain protein 3						√		
	Dehydrin WZY1 2					√			
	Cold acclimation protein WCOR410c					√			
	Ozone responsive stress related protein					√			

72. saat örneklerde ekspresyon artışı görülen Dehydrin (DHN) de bir LEA grubu proteindir ve bitki hücresinin özellikle kuruma gibi çevresel stres etkisinden

korunmasında etkin olan bir protein olmakla birlikte bitkilerde çeşitli patojenlere karşı oluşturulan cevaba katkı sağlamaktadır [182].

72. saatte anlatımı artan bir diğer protein “Ozone responsive stress related protein”dir. Hava kirletici özelliği olan ozon, etilen ve SA gibi bitki sinyal molekülleri ile patojen ve oksidatif savunma yollarını indüklemesi açısından fungal elisitörlerle benzerlik göstermektedir. Ortamdaki ozon patojen saldırısına karşı bitki savunma sistemine güç kazandırabildiği gibi indüklenmiş dayanıklılığa da yol açabilir [183]. Dolayısı ile tez çalışmasında ekspresyonu artan ozone responsive stress related protein, bitkinin pek çok farklı savunma reaksiyonu ile patojen saldırısına direnmeye çalıştığını göstermektedir.

Tanımlanan bir diğer stres proteini ise 48. saat örneklerindeki “70-kD Heat shock protein” (Hsp70)’dir ve bitkilerde çeşitli biyotik ve abiyotik stres durumlarında ekspresyonu artar. Normal gelişimsel sürecin önemli elemanları arasında yer alırken bir yandan da çeşitli stres faktörlerinde bitkiyi koruyucu görev yapar, özellikle patolojik durumlarda son derece önemlidir. Kanzaki vd. [184] tütünde yaptıkları çalışmada Hsp70 ve Hsp90’ın HR oluşumu için esas olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca buğday-*Pst* etkileşimi hakkında Duan vd. [185] tarafından yapılan çalışmada hem dayanıklılık hem de hassasiyet cevabında ekspresyonunun arttığını gözlenmiştir.

Sinyal İletimi Grubu Proteinler

Inokulasyonu takiben gerek bitki gerekse patojen cephesinde saldırı ve savunma mekanizmaları başta olmak üzere birçok fizyolojik süreç gerçekleşmektedir. Bitki-patojen arasındaki karşılıklı etkileşim bu süreçlerde rol oynayan birçok sinyal molekülünün algılanması ve karşı cevabın oluşumu, sinyal iletim mekanizması kapsamında gerçekleşir. Tez kapsamında, yoğun bir hücresel trafiğin yaşandığı buğday-*Pst* etkileşiminde sinyal iletim mekanizmasıyla ilişkilendirilen proteinler Çizelge 4.3’de özetlenmiştir. İlk 24 saat örneklerinde patojende tanımlanan sinyal iletiminden sorumlu protein “Protein tyrosine kinase (PTK)”dır. PTK’lar hücre dışı uyarıcılara ve çevresel değişikliklere karşı hücresel cevabı koordine eder. Bu süreçte diğer serine/threonine kinase, lipid kinase, phosphatase, phospholipase, small GTPase gibi sinyal iletim enzimlerini de tetikleyerek hücresel cevabın aktivasyonunu başlatır. PTK

sinyalizasyonu gelişim esnasında düzenli bir şekilde hücre çevresini ve hücre-hücre etkileşimlerini, doku onarımını garanti altına alır [186]. Tez çalışmasında 24. saat örneklerde ekspresyonunun artması patojen saldırısının başlaması ve devamındaki yoğun bitki savunma sürecinde rol oynayacak olan diğer sinyal iletimi proteinlerini aktive etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.3 Tanımlanan sinyal iletimi grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları

	SİNYAL İLETİMİ GRUBU PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
FUNGAL	Protein tyrosine kinase (PTK)	√							
	DNAJ domain containing protein							√	
	MAPK protein kinase 329 aa							√	
BİTKİSEL	Profilin	√							
	Small Ran Related GTP Binding Protein			√					
	Calmodulin (CaM)			√					
	Translationally Controlled Tumor Protein			√					
	14 3 3 protein (TaWIN1, Bmh2)					√			
	Protein disulfide isomerase					√			
	Small Ras-related GTP-binding protein								√

96. saat örneklerde anlatımı artan sinyal iletiminden sorumlu bir diğer protein, “DNAJ domain containing protein”dir ve moleküler şaperon Hsp40 ile yüksek homoloji göstermektedir. DNAJ, patojenisitedeki etkinliği bilinen Hsp70 proteininin ATPaz aktivitesini teşvik etmektedir [187]. Hsp40 grubu proteinlerin tümü yüksek derecede korunmuş 70 amino asit uzunluğunda J bölgesi (domain) içerir ve Hsp70’in N uçlu bölgesi ile interaksiyona girerek ATPaz aktivitesini artırır [188]. DNAJ proteinin, enfeksiyonu takiben 96. saat örneklerde ekspresyonunun artması, artan patojen istilasına paralel olarak yoğun protein sentezinin varlığını işaret etmektedir.

96. saat örneklerde tanımlanan bir diğer fungal protein “MAPK protein kinase”dır. MAPK’lara ökaryotlar başta olmak üzere hayvan, bitki ve fungus gibi organizmalarda sıklıkla rastlanmaktadır. Mitojen, osmotik stres, ısı şoku gibi uyarıcılar karşısında hücrel cevaba yol açan MAPK’lar çoğalma, gen ekspresyonu, farklılaşma, mitoz gibi süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar [189]. MAPK’ları oluşturan ana bileşenlerin

fungus patojenisite için de gerekli elementler olmasından dolayı MAPK'lar ayrı bir öneme sahiptir. Patojenik funguslarda sinyal iletimi aşamaları farklı seviyelerdeki hastalık sürecini kontrol eder. Örneğin *Ustilago maydis*' de tanımlanan MAPK'ın üreme ve patojenik gelişimi düzenlediği bildirilmiştir [190]. MAPK'lar bazı fungusal bitki patojenlerinde de konidia ve apresoryum oluşumunda ve dolayısıyla da enfeksiyon gelişiminde rol oynar. MAPK mutantlarında gelişen hiflerin hücre duvarları son derece zayıftır [191]. Ayrıca buğdayda *Puccinia triticea* ile yapılan çalışmada PtMAPK1 geninin ekspresyonu, patojenin bitkiyi enfekte ettiği sırada ve özellikle de urediosporların çimlenmesi esnasında arttığı gözlenmiştir [192].

Bitkilerde sinyal yolları hormonlar gibi özel moleküllere karşı cevap veya ışık, sıcaklık, biyotik/abiyotik stres gibi çeşitli çevresel uyarıcılara karşı aktive edilmektedir [193]. 24. saat örneklerinde Profilin (PROF), 48. saat örneklerinde Calmodulin (CaM), Small Ran Related GTP Binding Protein ve Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP), 72. saat örneklerinde 14.3.3 (TAWIN) protein ve Protein disulfide isomerase (PDI), 96. saat örneklerinde ise sadece Small Ras-related GTP-binding protein sinyal iletimindeki proteinler olarak tespit edilmiştir. Pek çok bitki grubunda kalsiyum iyonu önemli bir sinyal elemanı olarak görev yapmaktadır. Bitkilerdeki Ca^{+2} sinyalini algılayan birçok reseptör tanımlanmıştır. Bunlar arasında CaM en iyi bilinenlerden biridir ve ökaryotik organizmalar arasında iyi korunmuştur. Çok sayıda izoformu bulunan CaM'ların ekspresyonu biyotik ve abiyotik stres altındaki bitkilerde artmakta ve bu sayede ısı şoku proteinleri, kinazlar ve fosfatazlar gibi hedef enzim ve proteinler aktive edilmektedir [194]. Profilin ise, ilk olarak huş ağacı anterlerinde aktinle bağlantılı bir protein olarak tanımlanmış ancak sonraki yıllarda bitkilerde sinyal iletiminde önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur [195]. Özellikle patojenin tanınması ve savunma reaksiyonlarında etkin bir sinyal proteini olan MAPK'ın doğrudan substratı olarak tanımlanmış ve MAPK sinyal yolunun regülasyonunda rol aldığı rapor edilmiştir. Buğday ve *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* etkileşiminin incelendiği çalışmada [196] da hastalık gelişiminin kısıtlanmasında PROF'in baskılanmasının etkili olabileceği belirtilmiştir.

Çalışmada 48 ve 96. saat zaman dilimlerinde tanımlanan small GTP binding (G) proteinleri bitkilerdeki sinyal iletim mekanizmasının en önemli düzenleyicileridir. G proteinleri amino asit dizilimlerindeki benzerlik ve kabul edilen fonksiyonlarına göre,

Ras/Ras-like, Ran/TC4, Rho/Rac, Rab/Ypt ve Arf/Sar olmak üzere beş familyada sınıflandırılmıştır. Genel olarak fonksiyonları ise sırasıyla, hücre büyümesinin kontrolü, çekirdek stoplazmasındaki taşıma, mikro filament organizasyonu, vesikül trafiği ve ADP ribozilasyonudur [197], [198]. Tez çalışmasında tanımlanan Ran grubu G proteininin, hücresel trafiğin yoğun olduğu 48. saat diliminde ekspresyonunda artış gözlenirken, genellikle hücre büyümesinde rol aldığı bilinen Ras grubu G proteininin ise enfeksiyon sonucu büyüme ve gelişmesi git gide gerileyen bitkinin 96. saat diliminde ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. 48. saatte ekspresyon artışı gözlenen ve genellikle hayvan, fungi gibi organizmalarda hücre büyüme düzenleyici olarak rol oynadığı bilinen Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP)'inin bitkide de GTPaz bağlama yüzeyleriyle ilgili olarak büyüme düzenleyici etkisi olduğu belirtilmiştir [199], [200]. *Arabidopsis* bitkisinde TCTP'nin susturulduğu çalışmada [199] bitkinin yavaş vejetatif gelişim gösterdiği ve azalan hücre boyutu nedeniyle yaprak büyümesinin engellediği rapor edilmiştir. Bu bağlamda tez çalışmasındaki ekspresyon artışının fungal saldırı sonucu bitki fizyolojik gelişiminde gerçekleşen gerilemeye etkisi olduğu düşünülmektedir. Çalışma kapsamında 72. saat örneklerde anlatımı artan diğer proteinler ise sinyal iletiminde önemli rol oynadığı bilinen [201] 14.3.3 protein ve moleküler Endoplazmik retikulum (ER) şaperonu olarak görev alan PDI'dır. Bitki savunma cevabı gibi önemli hücresel süreçleri düzenlediği bilinen bitkisel 14.3.3 proteinlerinin, arpayla yapılan bir çalışmada da fungal gelişim esnasında ekspresyonunun arttığı görülmüştür [202]. ER'de işlenen proteinlerin kalite kontrolünde kritik rol üstlenen PDI ise çoğu stres durumunda sinyal cevabının düzenlenmesinde de görev almaktadır. Bitkide başarılı bir savunma cevabı oluşturmak için reseptör benzeri kinazların indüklenmesine yardımcı olarak ER şaperonlarının miktarında artış gözlemlendiği belirlenmiştir [203]. Bununla birlikte patojen saldırısına uğramış dayanıklı hatta bile PDI'nin indüklendiği rapor edilmiştir [204].

Transporter Grubu Proteinler

Biyolojik süreçlerde gerekli olan molekülerin hücreler arası taşınımı, hücresel enerjinin kullanılıp kullanılmamasına göre aktif veya pasif taşıma şeklinde gerçekleşmektedir. Hücre zarında yerleşmiş olan bir kısım taşıyıcı proteinler, hücre içerisine nelerin girip çıktığını düzenlemesinin yanı sıra, özellikle bazı fitopatojenik funguslarda virülens

faktör olarak da görev almaktadır [81]. Örneğin ATP-binding cassette (ABC) transporter olarak bilinen taşıyıcı proteinin patojen site faktörlerinin salgılanması veya konukçu tarafından üretilen savunmayla ilişkili bileşiklere karşı fungusu koruması yoluyla hastalık gelişimine destek olduğu bilinmektedir. Buğdayda *Pst* gelişiminin incelendiği çalışmada klonlanan *Lr34/Yr18* genlerinin ABC transporter olarak görev aldıkları ve hastalık gelişiminde etkin rol oynadığı bildirilmiştir [205]. Tez çalışması kapsamında, 24. saat örneklerde de membran transport proteinlerden (Çizelge 4.4) ABC transporter olarak bilinen fungal DppC proteininin, ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Bitki-patojen etkileşiminde farklı pek çok savunma reaksiyonunun yoğun olarak işlediği ilk 24 saat sürecinde DppC ekspresyonunun artışı, saldırı amaçlı proteinlerinin salgılanmasının etkin biçimde yürütüldüğünü düşündürmektedir.

Çizelge 4.4 Tanımlanan transporter grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları

	TRANSPORTER GRUBU PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
FUNGAL	Dipeptide transport system permease protein (DppC)	√							
	Outer Membrane Fimbrial Usher Porin			√					
	Cation Transporter			√					

48. saat örneklerde ekspresyonu artan bakteriyel orijinli Outer Membrane Fimbrial Usher Porin (FUP) proteini hücrenin genel salgı yolağının son aşamalarında yer alan şaperon grubu bir proteindir [206], [207]. Şaperonların, patojenezis ile ilişkili yüzey yapılarının gelişiminde etkin olduğu bilinmektedir [208]. Yine 48. saatte ekspresyonu artan bir diğer protein olan “Cation transporter proteininin” birincil fonksiyonu hücre membranından pozitif yüklü iyonların (katyon) geçişini kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte çift değerli Nramp1 (murine natural resistance-associated macrophage protein-1) geninin oksidan düzenlemesiyle ilgili yapılan çalışmada düşük seviyedeki cation transporter proteininin patojen gelişimini desteklediği rapor edilmiştir [209]. Örneğin demir (Fe), patojenlere karşı savunma mekanizması gibi birçok hücresel faaliyette önemli bir element olmasına karşın, serbest Fe’in reaktif oksijen türlerini ürettiği yine aynı çalışmada bildirilmiştir.

Transkripsiyon Grubu Proteinler

Bitkide, patojenle etkileşim sonrası gerçekleşen biyolojik süreçlerde birçok genin aktifleşerek eksprese edildiği görülmektedir. Bu genlerinin transkripsiyonunu promoterler, zenginleştiriciler ve baskılayıcılar olarak isimlendirilen farklı düzenleyici elemanlar etkilemektedir. Farklı DNA sekanslarından oluşan bu elemanlar, DNA'nın belirli bir bölgesine bağlanan proteinler için bağlanma bölgelerini oluşturmaktadır. Bu proteinler DNA'ya, içerdikleri Heliks–Dönü–Heliks, Çinko Parmağı ve Lösin Fermuarı gibi bazı ortak motifler aracılığı ile bağlanmaktadır [210]. Tez çalışmasında da bu ortak motiflere özgü proteinler hem patojende hem de bitkide tanımlanmıştır (Çizelge 4.5). 72. saat örneklerde tanımlanan patojene ait DNA kıvrılmasında etkin rol oynayan transkripsiyonel protein “Integration host factor (IHF) α subunit”in ekspresyonunda azalma gözlenirken, 96. saatte yine DNA bağlanması ve kıvrılması gibi süreçlerde etkin “Transcriptional regulator AraC family” ve “Sigma 54 dependent DNA binding response regulator” proteinlerinin ekspresyonu artmıştır. AraC family proteinlerin patojende stres cevabını düzenlediği ve enfeksiyon geliştirmesinde etkin olduğu da raporlanmıştır [211].

Çizelge 4.5 Tanımlanan transkripsiyon grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları

	TRANSKRİPSİYON GRUBU PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
FUNGAL	Integration host factor alpha subunit						√		
	Transcriptional regulator AraC family							√	
	Sigma 54 dependent DNA binding response regulator							√	
BİTKİSEL	CCAAT-box transcription factor complex WHAP8	√							
	NFXL1					√			
	MADS box transcription factor					√			
	BolA like protein domain containing protein expressed					√			
	Basic transcription factor 3								√
	Quinone reductase 2							√	

Bitkideki transkripsiyonel proteinler de çoğunlukla 72 ve 96. saatlerde tanımlanmıştır. 72. saat örneklerde anlatımı artan proteinlerden ilki NFXL1'dir. Çinko parmağı motifli transkripsiyon faktörü grubuna giren NFXL1 protistalardan bitkilere kadar geniş bir

organizma grubunda gözlenmektedir [212]. Özellikle *Arabidopsis*'de fonksiyonlarının çalışıldığı NFXL proteinleri (NFXL1 ve NFXL2), mildiyö enfeksiyonunda da pozitif ozmotik stres düzenleyici olarak tanımlanmıştır [213]. Ayrıca bitkilerde ROS üretimini tetiklediği ve abiyotik stres cevabına olanak sağlamak için biyotik stres cevabını baskıladığı rapor edilmiştir [212]. Bitkinin patojene karşı savunma cevabının nisbeten azalıp metabolik süreçlerle ilişkili proteinlerin anlatımının arttığı 72. saat diliminde NFXL1 proteinin ekspresyonunun artması da benzer bir fonksiyon üstlendiğini düşündürmektedir.

Tanımlanan proteinler içerisinde sinyal iletiminde önemli rol oynadığı da bilinen "MADS box transcription factor"ün hücre büyüme ve çoğalmasıyla ilişkili çeşitli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde etkin kofaktörlerle etkileşime girerek bitki gelişiminin kontrolüne katkı sağladığı belirtilmiştir [214]. Buğday bitkisinde yapılan çalışmalarda WAP1, WPI1, WPI2, WAP3, WAG ve TaMADS1 gibi MADS box transkripsiyon faktörleri tanımlanmasına rağmen [215] patojenle etkileşiminde ekspresyonunda değişimin meydana geldiği çalışmalara rastlanmamıştır.

Tanımlanan bir diğer protein "BoIA like protein domain"dir ve bitkilerdeki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte bitkide stres cevabında ekspresyonunun incelendiği çalışmalar mevcuttur [216]. 96. Saatte ekspresyonunda azalma meydana gelen "Basic transcription factor 3 (Btf3)"ün HR ilişkili genlerin ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Biberde Btf3 transkripsiyon faktörünün susturulduğu çalışmada [217] dayanıklı çeşitte tütün mozaik virüsü karşısında HR oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir. Enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında (96.saat) yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeye çalışan bitkide savunmayla ilişkili genlerin transkripsiyonunu azaltmış olabileceği düşünülmektedir.

Metabolizma Grubu Proteinler

Tanımlanan proteinler incelendiğinde çok sayıda proteinin metabolizma reaksiyonlarında görevli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Metabolizma grubu proteinler fungal proteinlerde %4-%34 arasında değişirken buğdaya ait proteinlerde %9-%21 arasındadır (Şekil 3.17). Fungal metabolizma grubu proteinler arasında ağırlıklı olarak karbohidrat metabolizmasında rol alan enzimler (Glycoside hydrolase,

Transaldolase, Malate dehidrogenase) tanımlanmıştır. Diğerleri ise isoprenoid biyosentezi, nukleik asit, nitrat ve karbon metabolizmasının rol alan proteinlerden oluşmaktadır. Bitkisel metabolizma grubu proteinler arasında da benzer biçimde karbohidrat metabolizmasında rol alan proteinler (Fructose biphosphate aldolase, sedoheptulose 1 7 biphosphatase, cytosolic malate dehydrogenase, Bp2A protein, Cp31bhv, phosphoribulokinase, phosphoglycerate kinase, cytosolic glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, S adenosyl methionine synthetase) çoğunluktadır.

Çizelge 4.6 Tanımlanan metabolizma grubu proteinleri ve ekspresyon farklılıkları

	METABOLİZMA GRUBU PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
FUNGAL	Geranylgeranyl diphosphate synthase 3	√							
	Recombinase A	√							
	Oxaloacetate decarboxylase alpha subunit	√							
	NapB	√							
	Pyrroloquinoline Quinone Synthase Partial Uncultured			√					
	Carbonic Anhydrase			√					
	Glycoside hydrolase 15 like protein					√			
	RNA binding zinc finger protein RanBP2 type					√			
	Transaldolase					√			
	TRIOSEphosphate isomerase					√			
	Malate dehydrogenase					√			
	Monomeric glyoxalase I					√			
	ELP3 histone acetyltransferase							√	
BİTKİSEL	Putative glycine decarboxylase subunit		√						√
	Phosphoribulokinase		√			√			
	Phosphoglycerate kinase					√			√
	Putative glyoxalase I	√							
	S adenosyl methionine synthetase 2	√							
	Cytosolic glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	√							
	Single stranded nucleic acid binding protein	√							
	Glycine rich RNA binding protein		√						
	Cp31bhv				√	√			
	Peptidylprolyl Isomerase				√				
	RNA Binding Ras GAP SH3 Binding Protein			√					
	Geranylgeranyl Hydrogenase			√					

	Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase			√				√	
	Bp2A protein					√			
	Fructose biphosphate aldolase					√		√	
	Cytosolic malate dehydrogenase							√	
	Formate dehydrogenase partial							√	
	Sedoheptulose 1 7 biphosphatase								√
	Adenylate kinase A-like							√	

Biyotrofik patojenler, gelişmek ve çoğalmak için konaklarının canlı olmasına ve bu organizmalardan sağlayacakları besin ve kimyasallara ihtiyaç duyarlar. Bu besin maddeleri içinde karbohidratların ayrı bir önemi vardır ve bu nedenle patojen saldırısının ardından bitki de çeşitli metabolik değişimler olmakla birlikte karbohidrat metabolizmasındaki değişimler çok daha belirgindir. Karbohidratlar patojenisite için olduğu kadar bitki savunması içinde önemlidir. Sukroz ve sukrozun yıkılma ürünleri olan glukoz ve fruktoz yüksek bitkilerde hem metabolizma hem de çeşitli uyarıların algılanmasında temel sinyal molekülleri olarak görev yapar. Bu moleküllerin hızlı dolaşımı bitki-patojen etkileşiminin dayanıklılık mı yoksa enfeksiyon gelişimi mi şeklinde sonuçlanacağını önemli ölçüde etkiler [218]. Özellikle, savunma sürecinde hedef hücrelerdeki karbon akışının sukrozdan heksoza doğru yeniden programlanması çok önemli olabilmektedir. Bu nedenle bitki-patojen etkileşiminde karbohidrat metabolizmasındaki değişimlerin etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır ancak bu değişimlerin dayanıklılık veya enfeksiyon gelişimindeki büyük etkileri net olarak anlaşılamamıştır. Dayanıklılık/enfeksiyon gelişimi ile karbohidrat durumu arasındaki karşılıklı ilişkinin karmaşıklığını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Bunlardan ilki, daha öncede bahsedildiği gibi karbohidrat durumu bitkinin genel metabolizmasını etkilediği kadar savunma yanıtını da etkiler. İkincisi, şekerler hem bitki hem de patojen için sadece besin kaynağı değil aynı zamanda sinyal molekülleridir. Bu nedenle karbohidratların metabolize edilme düzeylerindeki değişim, patojen genlerinin ekspresyonunu ve patojenin yayılışını etkileyebilmektedir. Üçüncü faktör, mevcut patojenler invertaz, fruktoeksohidrolaz ve levansukraz gibi ekstrasellüler sükroz yıkım enzimlerine sahiptir. Patojen, bu enzimlerin ekspresyonu ile apoplasttaki sükroz ve heksoz seviyelerini değiştirirerek patojenitesini arttırabilmektedir [219]. Dolayısıyla tez çalışmada, bitki-patojen etkileşiminde hem bitki hem de patojen açısından önemli olduğu ve gelişecek cevabın seyrine önemli ölçüde etki ettiği öngörülen karbohidrat

metabolizmasına dair çok sayıda proteinin tanımlanması bu öngörülerini destekler niteliktedir.

Enerji Metabolizması Grubu Proteinler

Enerji metabolizması kapsamında tanımlanan proteinlere bakıldığında (Çizelge 4.7) patojen inokulasyonu sonrasında bitkide gerçekleşen savunma mekanizması boyunca bitkinin normal koşullarda fotosentez gibi yaşamsal faaliyetlerinde önem taşıyan mekanizmalarda kullandığı enerjiyi yoğun bir şekilde patojen saldırısını baskılamak için sarfettiği gözlenmiştir. Patojen saldırısı sonucunda bitki fotosentezinin azaldığı literatürdeki çalışmalarda da raporlanmıştır [220], [221], [222]. Patojen saldırı ve istilasının iyice arttığı 72. saat zaman dilimine gelindiği ise enerji metabolizması ile ilgili protein ekspresyonlarındaki artış ve azalışların, bitki metabolizmasında patojen için kullanımına yönelik yeni düzenleme olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Çizelge 4.7 Tanımlanan enerji metabolizması grubu proteinler ve ekspresyon farklılıkları

	ENERJİ GRUBU PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
FUNGAL	Cytochrome oxidase subunit I	√							
BİTKİSEL (Elektron Transportu + Fotosentez)	Ferredoxin NADP H Oxidoreductase		√	√			√		√
	Ferredoxin nitrite reductase precursor					√			
	Ferredoxin chloroplastic Flags Precursor								√
	Cytochrome c oxidase subunit					√			√
	ATP synthase CF1 epsilon subunit					√			
	Cytochrome f					√			
	Thioredoxin M						√		√
	Plasma membrane ATPase - Proton pump					√			
	Cytochrome b6 f complex iron sulfur subunit					√			√
	Cytochrome B6								√
	ATP synthase CF1 beta subunit								√
	ATPase alpha subunit								√
	Putative Rieske Fe S precursor protein							√	
	RuBisCo activase B		√		√				
	RuBisCo oxygenase large subunit		√			√			√
	Photosystem II oxygen evolving complex protein		√	√			√		√

23kDa oxygen evolving protein of photosystem		√				√		√
Chloroplast RuBisCo activase		√						√
Putative Oxygen Evolving Complex Precursor				√		√		√
Photosystem I 9kda Protein				√	√			
Calvin cycle protein CP12-like					√			√
Oxygen evolving enhancer protein 1 chloroplastic Short OEE1						√		
33kDa oxygen evolving protein of photosystem II					√			√
Oxygen evolving complex precursor					√		√	
Photosystem II polypeptide						√		
Oxygen evolving enhancer protein 2						√		
Photosystem I 8 kDa subunit						√		
Photosystem I subunit C					√			
Photosystem I subunit VII					√			
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic-like								√
Putative RuBisCo small subunit								√

Patojen saldırısı bitki savunma mekanizmasının yanı sıra primer ve sekonder metabolizmalarda da değişikliklere yol açar [219]. Biyotrofik özellikteki patojenin, enfeksiyonu sonrası primer metabolizmadaki değişimler çoğunlukla enfekteli doku içerisinde gerçekleşse de patojen istilası arttıkça bunların beslenebilmesi için metabolik değişimler enfekteli olmayan dokular yönünde de ilerlemektedir. Bununla birlikte enfekteli dokular içerisinde henüz patojen saldırısına maruz kalmamış ve fotosenteze devam eden hatta enfekteli dokulardaki fotosentez kaybını dengelemek için daha fazla fotosentez gerçekleştiren dokular yer almaktadır [223]. Bu nedenle 72. ve 96. Saat örneklerde bazı fotosentetik proteinlerin ekspresyonunda artışlar gözlenmiştir.

Bitkide fotosentez sırasında gerçekleşen çok sayıda reaksiyon fotosentetik elektron transferi ve karbon fiksasyonu reaksiyonları olarak iki büyük kategoride incelenmektedir [224]. Tez çalışmasında tanımlanan fotosentez proteinleri de bu iki kategori altında değerlendirilmiştir. Işık reaksiyonları olarak da bilinen fotosentetik elektron transferi kapsamında çok sayıda tanımlanan ve elektron taşıyıcı olarak görev alan ferrodoksinler, sitokrom a,b,c ve demir-sülfür proteinleri gibi proteinlerin ekspresyonlarındaki değişim enfeksiyona uğramış ve henüz uğramamış dokularda gerçekleşen yoğun fotosentez reaksiyonlarına işaret etmektedir. Tanımlanan proteinler içerisindeki NADP-malat dehidrojenazı aktive ettiği bilinen [225] Thioredoxin M'nin 72 ve 96. saat zaman dilimlerinde ekspresyonunda artış gözlenmiştir ve tüm zaman

dilimlerinde rastlanan ferrodoksin proteinleri ile birlikte işlev görerek kloroplastlardaki fotosentezi düzenlediği yapılan çalışmada belirtilmiştir. Bununla birlikte thioredoxin'lerin bitki antioksidan savunma mekanizmasında rol aldığı da düşünülmektedir [226]. Uyarılmış klorofil molekülleri tarafından yakalanan ışık enerjisini kullanarak kimyasal enerjiye katalizyen fotosistem ilişkili proteinlerin de ekspresyonlarında değişimlere rastlanılmıştır. Fotosistem I ve II gibi fotokimyasal reaksiyon merkezlerinde rol alan birçok proteinin çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarında ekspresyonlarının değişimi yapılan birçok çalışmada raporlanmıştır [219], [227], [228]. Patojen kendi yaşamsal ihtiyaçlarını karşılayabilmek için bitki karbohidrat metabolizmasını ele geçirmeye çalıştığını düşündürmektedir.

Protein Metabolizması Grubu Proteinler

Bitki-patojen etkileşimi süresince protein düzeyinde gerçekleşen birçok değişim tez çalışmasında protein metabolizması ile ilişkili tanımlanan proteinlerin (Çizelge 4.8) ekspresyonlarıyla da kendini göstermiştir. Bu bağlamda özellikle proteinlerin yıkımında aktif rol alan proteazlar ve proteazların kontrolünde rol alan proteaz inhibitörleri dikkat çekmektedir. Bitkide protein metabolizmasının yoğun olarak işlediği, hem patojen saldırısının yoğun biçimde sürdürüldüğü ve hem de bu saldırı ve istila nedeniyle yaşamsal faaliyetlerde meydana gelen değişimler sonucunda 72. saat zaman diliminde anlatımı artan proteinlerden en dikkat çeken “Clp proteas”dır. Bu protein, önemli fonksiyonlarının yanı sıra moleküler şaperon aktivitesi de gösterdiği bilinen ATPazın düzenlenmesinde etkin alan bir proteazdır [229]. Yine birçok çalışmada [230], [231], [232], [233] biyotik veya abiyotik stres koşullarında ekspresyonlarına rastlanan ve proteinaz inhibitör olarak görev alan wali3, wali5, Cysteine proteinase inhibitör ve Cystatin WC1 proteinlerinin de ekspresyonlarında artış meydana geldiği görülmüştür. Proteaz inhibitörlerinin bitkide patojen saldırısına cevap sürecinde indüklendiğine daha önceki çalışmalarda da rastlanılmıştır [230]. Protein biyosentezinin önemli aşamalarından translasyon esnasında polipeptit zincirlerinin uzamasında aktif rol alan “Elongation factor 1 alpha” nında ekspresyonunda artış görülmüştür.

Çizelge 4.8 Tanımlanan protein metabolizması grubu proteinler ve ekspresyon farlılıkları

	PROTEİN METABOLİZMASI GRUBU PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
FUNGAL	Elongation factor 1 alpha					√			
	Polyubiquitin A 610 aa							√	
BİTKİSEL	Putative proteinase inhibitor related protein	√							
	Triticain Alpha			√					
	Cysteine proteinase inhibitor					√		√	
	Cystatin WC 1					√			
	Wali3					√			
	Wali5					√			
	ATP dependent Clp protease proteolytic subunit					√			

Yapı Grubu Proteinler

Tez çalışmasında fungal organizmaya ait yapısal proteinler olarak tanımlanan proteinlerin (Çizelge 4.9) hepsinde ekspresyon artışı gözlenmiştir. Hücresel iskeletin yapısına katılan aktin proteinlerinin patojen saldırısının gerçekleştiği ilk saatler ve bitki savunma cevabının hücresel boyutta tolere edilmeye çalışıldığı ileriki zaman dilimlerinde yoğun şekilde işlevsel olduğu bu ekspresyon artışlarından da anlaşılmaktadır. Hücreye mekanik destek sağlaması, oluşumuna katıldığı yapılar sayesinde hareketine olanak sağlaması, hücre bölünmesine katkı sağlaması gibi fonksiyonları bilinen aktin proteinlerinin patojenin virülensliğinde de etkili olduğu yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir [234], [235].

Çizelge 4.9 Tanımlanan yapı grubu proteinler ve ekspresyon farlılıkları

	YAPI GRUBU PROTEİNLER	24. Saat		48. Saat		72. Saat		96. Saat	
		Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma	Artma	Azalma
FUNGAL	Actin	√							
	Dethiobiotin Synthetase			√					
	Actin 376 aa					√			
	Beta tubulin					√			
	Gamma actin					√			

Bilinmeyen Proteinler

Çalışma sonunda patojene ait tanımlanan fungal proteinlerin %70'i, mevcut veri tabanlarında bulunan tanımlanmış herhangi bir protein ile homoloji göstermeyen proteinlerdir ve hypothetical olarak ifade edilmektedirler. Hem *Pst* genom projesinin veri analizi kısmının da tamamlanmasıyla hem de yeni çalışmalarla mevcut protein veri bankalarının zenginleştirilmesi ile tanımlanamayan bu gibi proteinlerin anlam kazanacağı düşünülmektedir. Bu takdirde şu anda değerlendirilemeyen ve özellikle patojen istilasının yoğunlaştığı 72 ve 96. saat örneklerde bulunan, bu nedenle de hastalık gelişiminde önemli oldukları düşünülen proteinlerin tanımlanması mümkün olabilecektir.

Sonuç olarak, tez çalışmasında tanımlanan proteinlere bakıldığında;

Patojenin öncelikle bitki hücrelerine giriş ve istila yönünde yoğun çaba gösterirken bir yandan da sürekli olarak bitki savunmasına karşı koymak ya da baskılamak şeklinde saldırısına devam ettiğini göstermektedir. Buna karşılık bitkinin de antifungal proteinler, toksinler, ROS'lar ve PR proteinleri gibi bilinen birçok savunma yanıtı ile patojeni öldürme, büyüme ve gelişimini durdurmaya yönelik savunma yaptığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte ilk 24 ve 48. saat örneklerde tanımlanan proteinler arasında ağırlıklı olarak hem fungal saldırı ve hem de bitki savunma grubu proteinler bulunurken daha sonraki zaman dilimlerinde ise ekspresyon değişimleri diğer grup proteinlerde daha fazla gözlenmiştir. Bu nedenle buğday-*Pst* etkileşimindeki en yoğun ve kritik saatlerin ilk 48 saat olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, elde edilen sonuçlar, daha önce dayanıklı çeşitte yapılan çalışma [25] ile kıyaslandığında, buğday-*Pst* etkileşiminde bitki yanıtının hastalık mı yoksa dayanıklılık şeklinde mi gelişeceği konusunda belirleyici sürecin HR olduğunu düşündürmektedir.

Son yıllardaki teknolojik gelişmeler sayesinde proteomik yaklaşımlar, özellikle bitkilerde son derece karmaşık olan biyotik/abiyotik stres yanıtında işlevsel gen/gen ürünlerinin belirlenmesinde daha somut veriler ortaya koyması açısından tercih edilen bir araştırma alanı olmuştur. Sunulan tez çalışması, literatürde karşılaştığımız buğdayda sarı pas hastalığına karşı bitkinin hassasiyet cevabının incelendiği en kapsamlı proteomik çalışmadır ve elde edilen sonuçlar açısından da son derece özgün bulgular içermektedir. Bu sonuçlar, bugüne kadar aynı amaçla yapılmış olan pek çok genomik ve transkriptomik çalışmayı tamamlayıcı niteliktedir. Bunun yanı sıra mevcut verilerle birlikte bitki-patojen etkileşimindeki moleküler mekanizmaların daha anlaşılır olmasına önemli katkılar sağlayabilecektir. Dolayısıyla çalışmamızdan elde edilen verilerin hastalığın kontrolü için daha etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine de katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Gümüş, E., (2000), Türkiye’de Yerleşme, Çağdaş Dünya Tarihi, AÖF Yayınları, 182:87, <http://w2.anadolu.edu.tr/aos/kitap/IOLTP/2291/unite07.pdf>, 20.09.2012.
- [2] Karagöz, A., Zencirci, N., Tan, A., Taşkın, T. Köksel, H., Sürek, M., Toker, C. ve Özbek, K., (2010). “Bitki Genetik Kaynaklarının Korunması ve Kullanımı”, Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak 2010, Ankara.
- [3] Bilgiç, H., (2003). Anadolu uygarlıklarının izinde buğdayın kökleri, Buğday Dergisi Yayınları, 34, Ankara.
- [4] USDA, (2012). Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Triticum aestivum*L.,<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=TRAE&display=31>, 09.08.2012.
- [5] Cao, W., (1997). Wheat taxonomy and cultivar identification using molecular markers, Doktora tezi, Department of Crop Science and Plant Ecology, Univ. Of Saskatchewan, Saskatoon, SK. Canada.
- [6] ITIS, (2012). The Integrated Taxonomic Information System, <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>, 10.08.2012.
- [7] Peng, J.H., Sun, D. ve Nevo, E., (2011). “Domestication evolution, genetics and genomics in wheat”, Mol Breeding, 28:281–301.
- [8] Zoccatelli, G., Sega, M., Bolla, M., Cecconi, D., Vaccino, P., Rizzi, C., Chignola, R. Ve Brandolini, A. (2012). “Expression of a-amylase inhibitors in diploid *Triticum* species”, Food Chemistry, 135(4):2643-9.
- [9] TÜİK, (2011). Bitkisel Ürünlerin Üretim Değeri, http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=45, 19.09.2012.
- [10] Yıldırım, A., Sakin, M.A., ve Gökmen, S., (2005). “Tokat Kazova koşullarında bazı ekmeklik buğday çeşit ve hatlarının verim ve verim unsurları yönünden değerlendirilmesi”, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 22(1):63-72.
- [11] FAO, (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>, 05.08.2012.

- [12] Agro-MAPS, (2012). Global Spatial Database of Agricultural Land-use Statistics, <http://kids.fao.org/agromaps/>, 05.08.2012.
- [13] TÜİK, (2011). Bitkisel Üretim İstatistikleri, http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=45, 07.08.2012.
- [14] FAO, (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, 09.08.2012.
- [15] TÜİK, (2011). Bitkisel Ürün Denge Tabloları, http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=45, 07.08.2012.
- [16] Demir, A., (2007). Buğday, T.E.A.E.-Bakış, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, 9:1-4.
- [17] FAO, (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/site/537/DesktopDefault.aspx?PageID=537>, 05.08.2012.
- [18] Madlung, A., ve Comai, L., (2004). "The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure", *Annals of Botany* 94: 481–495.
- [19] Lichtenthaler, H.K., (1996). "Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants" *Journal of Plant Physiology*, 148: 4–14.
- [20] ISPP, (2012). The world's staple crops and their principal diseases, http://www.isppweb.org/foodsecurity_activity1_sec5.asp, 06.08.2012.
- [21] Çıtır, A. (2009). Bitki Hastalık ve Zararlılarının Buğday Kalitesi ve Ürün Verimine Etkileri, Namık Kemal Üniversitesi, <http://www.tdag-ticbor.org.tr/tr/>, 02.10.2012.
- [22] Günaydın, G., (2010). Buğdayda Küresel-Yerel Oyunlar, TBMMO Ziraat Mühendisleri Odası, Haber Bülteni, 94:6.
- [23] Düşünceli, F., Mert, Z., Akan, K., Çetin, L. ve Albostan, S., (2008). "Ug 99'a Karşı Küresel Yaklaşımlar ve Türkiye Çalışmalarına Genel Bakış", Ülkesel Tahıl Sempozyumu, 02-05.06.2008, Konya.
- [24] Çetin, L., Düşünceli, F., ve Albustan, S., (1999). "Wheat stripe rust virulences and reactions of registered varieties in field nurseries in Ankara/Turkey in the period 1991 - 1999". In 'Wheat in a global environment, 6th International Wheat Conference Abstracts, Z. Bedo, Ed.', 5-9.06.2000, Budapest – Hungary.
- [25] İnan, C., (2012). Sari Pas Enfeksiyonuna Dirençli Buğday (*Triticum aestivum* L.)'da Proteomik Analizler, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [26] Li, G. Q., Li, Z. F., Yang, W. Y., Zhang, Y., He, Z. H., Xu, S. C., Singh, R. P., Qu, Y. Y. ve Xia, X. C., (2006). "Molecular mapping of stripe rust resistance gene YrCH42 in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with Yr24 and Yr26", *Theor. Appl. Genet.*, 112:1434-1440.
- [27] Chen, X.M., (2005). "Epidemiology and control of stripe rust on wheat [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat", *Can J Plant Pathol*, 27:314-337.

- [28] Wellings, C.,R., (2011). "Global status of stripe rust: a review of historical and current threats", *Euphytica*, 179:129–141.
- [29] Roose-Amsaleg, C., de Vallavieille-Pope, C., Brygoo, Y. ve Levis, C., (2002). "Characterisation of a length polymorphism in the two intergenic spacers of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent wheat yellow rust", *Mycol. Res.*, 106(8):918–924.
- [30] Wang, Y., Zhu, M., Zhang, R., Yang, H., Wang, Y., Sun, G., Jin, S. ve Hsiang, T., (2009). "Whole genome amplification of the rust *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from single spores", *J Microbiol Methods.*, 77(2):229-34.
- [31] Curtis, B.C., Rajaram, S. ve Macpherson, H.G., (2002). "Bread Wheat Improvement and Production", *FAO Plant Production and Protection Series*, 30:6.
- [32] Jin, Y., (2010). "Role of *Berberis* spp. as alternate hosts in generating new races of *Puccinia graminis* and *P. striiformis*", *Euphytica*, 179(1):105-108.
- [33] GKGM, (2012). Buğday Pas Hastalıkları, Zirai Mücadele Teknik Talimatı, http://www.gkgm.gov.tr/birim/bitki_karantina/faaliyet/teknik_talimat/hububat/bugday_pas_hast.pdf, 02.10.2012.
- [34] Martinez, A., Youmans, J. ve Buck, J., (2012). "Stripe Rust (Yellow Rust) of Wheat", *The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences Publications*, 960.
- [35] Broad Institute, (2012). "What is *Puccinia striiformis*?", *Puccinia Group Database*, http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/puccinia_group/MultiHome.html, 02.10.2012.
- [36] İstanbul İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, (2012). Tarla Bitkileri Hastalıkları Teknik Bilgiler, <http://www.istanbultarim.gov.tr/docs/bitkikoruma/TeknikBilgiler/TarlaBitkileriHastaliklari.pdf>, 06.09.2012.
- [37] Department of Primary Industries, (2008). Stripe Rust of Wheat, <http://www.dpi.vic.gov.au/agriculture/pests-diseases-and-weeds/plant-diseases/grains-pulses-cereals/stripe-rust-of-wheat>, 09.08.2012.
- [38] Bux, H., Ashraf, M., Hussain, F., Rattu, A.R. ve Fayyaz, M., (2012). "Characterization of wheat germplasm for stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) resistance", *Aus. J. Crop Sci.*, 6(1):116-120.
- [39] Morgounov, A., Karabayev, M., Bedoshvili, D. ve Braun, H.J., (2001). "Improving Wheat Production in Central Asia and the Caucasus", *Research Highlights of the CIMMYT Wheat Program 1999-2000*, 65-68.
- [40] Zhonghu, H., (2001). "Chinese Wheat Production and The CIMMYT-China Partnership", *Research Highlights of the CIMMYT Wheat Program 1999-2000*, 61-64.
- [41] Mamluk, O.F., Çetin, L., Braun, H.J., Bolat, N., Bertschinger, L., Makkouk, K.M., Yıldırım, A.F., Saari, E.E., Zencirci, N., Albustan, S., Çalı, S., Beniwal, S.P.S. ve

- Düşünceli, F., (1997). "Current status of wheat and barley diseases of Central Anatolian Plateau of Turkey", *Phytopathology*, 36:167-181.
- [42] Düşünceli, F., Çetin, L., Albustan, S. ve Ekiz, H., (2000). "Orta Anadolu buğday ekilişlerinde pas hastalıklarının (*Puccinia* spp.) yaygınlığı, önemi ve alınması gereken tedbirler", Orta Anadolu'da Hububat Tarımının Sorunlar ve Çözüm Yolları Sempozyumu, 8-11.08.1999, Konya.
- [43] Mert, Z., (2010). "Ülkesel Serin İklim Tahıl Hastalıkları Araştırmaları Projesi", Serin İklim Tahılları Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı, 8-13.03.2010, Antalya.
- [44] Staskawicz, B.J., (2001). "Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance", *Plant Physiol*, 125:73-76.
- [45] Mehta, A., Brasileiro, A.C., Souza, D.S., Romano, E., Campos, M.A., Grossi-de-Sa, M.F., Silva, M.S., Franco, O.L., Fragoso, R.R., Bevitori, R. ve Rocha, T.L., (2008). "Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us?", *FEBS J.*, 275:3731-3746.
- [46] Biron, D.G., Nedelkov, D., Dorohée, M. ve Holzmüller P., (2011). "Proteomics and Host-Pathogen Interactions: A Bright Future?", *Elsevier*, 263-303.
- [47] Quirino, B.F., Candido, E.S., Campos, P.F., Franco, O.L. ve Krüger, R.H., (2010). "Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions", *Phytochemistry*, 71(4):351-62.
- [48] Moore, D., Robson, G.D. ve Trinci, A.P.J., (2011). *Fungi as pathogens of plants, 21st Century Guidebook to Fungi*, Cambridge University Press, Cambridge.
- [49] Pritchard, L. ve Birch, P.R.J., (2011). "A systems biology perspective on plant-microbe interactions; biochemical and structural targets of pathogen effectors", *Plant Science*, 180:584-603.
- [50] Buchanan, B.B., Gruissem, W., ve Jones, R.L., (2000). "Biochemistry and Molecular Biology of Plants", American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1367.
- [51] Perfect, E.S. ve Green, J.R., (2001). "Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens", *Mol. Plant Pathol.*, 2:101-108.
- [52] ENCYCLO, (2008). *Introductory Plant Pathology, Hemibiotrophic*, <http://www.encyclo.co.uk/local/21006>, 16.10.2012.
- [53] Mendgen, K. W., ve Hahn, M., (2002). "Plant infection and the establishment of fungal biotrophy", *Trends in Plant Science*, 7:352-356.
- [54] Kolmer, J.A., Ordonez, M., E., ve Groth, J.V., (2009). "The Rust Fungi", *eLS.* , DOI: 10.1002/9780470015902.a0021264.
- [55] Mares, D. J. ve Cousen, S., (1977). "The interaction of yellow rust (*Puccinia striiformis*) with winter wheat cultivars showing adult plant resistance: macroscopic and microscopic events associated with the resistant reaction", *Physiological Plant Pathology*, 10(3): 257-274.

- [56] Kemen, E., Kemen, A.C., Rafiqi, M., Hempel, U., ve Mendgen, K., Hahn, M. ve Voegelé, R.T., (2005). "Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells", *Molecular plant-microbe interactions*, 18: 1130-1139.
- [57] Anonim, (2004). "Fungal Biology", University of Sydney, <http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/Mycology/StructureFunction/haustoria.shtml>, 16.10.2012.
- [58] Lee, K. ve C. Lee. 1989. "The structure and development of the haustorium of *Cuscuta australis*", *Can. J. Bot.*, 67: 2975-2982.
- [59] Lazniewska, J., Macioszek, V.K., Lawrence, C.B., Kononowicz, A.K., (2010). "Fight to the death: *Arabidopsis thaliana* defense response to fungal necrotrophic pathogens", *Acta Physiol Plant*, 32:1–10.
- [60] Jones, J. D. G. ve Dangl, J. L., (2006). "The plant immune system", *Nature*, 444:323-329.
- [61] Bent, A. F., Mackey, D., (2007). "Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions", *Annu Rev Phytopathol*, 45:399-436.
- [62] Elmore, J.M. ve Coaker, G., (2011). "The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions", *Mol Plant.*, 4(3):416-27.
- [63] Buttner, D., ve He, S.Y., (2009). "Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria", *Plant Physiol.*, 150:1656–1664.
- [64] Eckardt, N.A., (2006). "Identification of Rust Fungi Avirulence Elicitors", *The Plant Cell*, 18:1-3.
- [65] Belkhadir, Y., Subramaniam, R. ve Dangl, J.L., (2004). "Plant disease resistance protein signalling: NBS–LRR proteins and their partners", *Current Opinion in Plant Biology*, 7:391–399.
- [66] Shah, J., (2005). "Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance", *Annual Review Phytopathology*, 43:229-226.
- [67] Dolar, F.S., Demirci, E., Basım, H., Demirci, F. ve Elibüyük, İ.Ö., (2011). Konukçu Bitkide Meydana Gelen Yapısal ve Fizyolojik Değişimler, *Fitopatoloji*, 2293, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
- [68] Agrios, G.N., (2005). *Plant Pathology*, 5th edition, Elsevier-Academic Press., San Diego, CA.
- [69] Lorang, J.M., Sweat, T.A. ve Wolpert, T.J., (2007). "Plant disease susceptibility conferred by a "resistance" gene", *P Natl Acad Sci USA*, 104: 14861–14866.
- [70] Aich, P., Potter, A. ve Griebel, P., (2009). "Modern approaches to understanding stress and disease susceptibility - A review with special emphasis on respiratory disease", *Int J Gen Med*, 1-14.

- [71] Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. ve Staskawicz, B.J., (2006). "Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response", *Cell*, 124:803–814.
- [72] Yang, B., Sugio, A. ve White, F.F., (2006). "Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:10503-10508.
- [73] Cantu, D., Govindarajulu, M., Kozik, A., Wang, M., Chen, X., Kojima, K., Jurka, J., Michelmore, R.W. ve Dubcovsky, J., (2011). "Next generation sequencing provides rapid access to the genome of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, the causal agent of wheat stripe rust", *PLoS ONE*, 6(8): e24230.
- [74] Hogenhout, S.A., Van Der Hoorn, R.A., Terauchi, R., ve Kamoun, S., (2009). "Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms", *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22: 115–122.
- [75] Rafiqi, M., Ellis, J.G., Ludowici, V.A., Hardham, A.R. ve Dodds, P.N., (2012). "Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions", *Curr Opin Plant Biol.*, 15(4):477-82.
- [76] Bakkeren, G., Song, X., Panwar, V., Linning, R., Wang, X., Rampitsch, C., McCallum, B., Fellers, J. ve Saville, B., (2012). "Functional genomic approaches in cereal rusts", *Can. J. Plant Pathol.*, 34(1): 3–12
- [77] Hu, G., Linning, R., McCallum, B., Banks, T., Cloutier, S. ve Butterfield, Y., (2007). "Generation of a wheat leaf rust, *Puccinia triticina*, EST database from stage-specific cDNA libraries", *Mol. Plant Pathol.*, 8: 451–467.
- [78] Xu, J., Linning, R., Fellers, J., Dickinson, M., Zhu, W. ve Antonov, I., (2011). "Gene discovery in EST sequences from the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* sexual spores, asexual spores and haustoria, compared to other rust and corn smut fungi", *BMC Genomics*, 12: 161.
- [79] Zhong, S., Leng, Y., Friesen, T.L., Faris, J.D., ve Szabo, L.J., (2009). "Development and characterization of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the wheat stem rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. tritici", *Phytopathology*, 99: 282–289.
- [80] Duplessis, S., Cuomo, C.A., Lin, Y.-C., Aerts, A., Tisserant, E. ve Veneault-Fourrey, C., (2011). "Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 9166–9171.
- [81] Ma, J., Huang, X., Wang, X., Chen, X., Qu, Z. ve Huang, L., (2009). "Identification of expressed genes during compatible interaction between stripe rust (*Puccinia striiformis*) and wheat using a cDNA library", *BMC Genomics*, 10: 586.
- [82] Yin, C., Chen, X., Wang, X., Han, Q., Kang, Z., ve Hulbert, S. (2009). "Generation and analysis of expression sequence tags from haustoria of the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. tritici", *BMC Genomics*, 10: 626.
- [83] Dong, Y.L., Yin, C.T., Hulbert, S.H., Chen, X.M., ve Kang, Z.S., (2011). "Cloning and expression analysis of three secreted protein genes from

- wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*", *World J Microbiol Biotechnol*, 27:1261–1265.
- [84] Ling, P., Wang, M. N., Chen, X. M. ve Campbell, K. G., (2007). "Construction and characterization of a full-length cDNA library for the wheat stripe rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)", *BMC Genomics*, 8:145.
 - [85] Catanzariti, A., Mago, R., Ellis, J. ve Dodds, P., (2011). "Constructing Haustorium-Specific cDNA Libraries from Rust Fungi", *Plant Immunity Methods in Molecular Biology*, 712: 79-87.
 - [86] Coram, T.E., Wang, M. ve Chen, X., (2008). "Transcriptome analysis of the wheat–*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction", *Molecular Plant Pathology*, 9(2):157–169.
 - [87] Xu, L., Jia, J., Lv, J., Liang, X., Han, D., Huang, L. ve Kang, Z., (2010). "Characterization of the expression profile of a wheat aci-reductone-dioxygenase-like gene in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses", *Plant Physiol. Biochem.*, 48: 461-468.
 - [88] Wang, X., Wang, X., Feng, H., Tang, C., Bai, P., Wei, G., Huang, L. ve Kang, Z., (2012). "TaMCA4, a novel wheat metacaspase gene functions in programmed cell death induced by the fungal pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*", *Mol Plant Microbe Interact*, 25(6):755-64.
 - [89] Bozkurt, T.O., McGrann, G.R.D., MacCormack, R., Boyd, L.A., Akkaya, M.S., (2010). "Cellular and transcriptional responses of wheat during compatible and incompatible race-specific interactions with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*", *Mol Plant Pathol*, 11: 625–640.
 - [90] Singh, S., Hernandez, M.V., Crossa, J., Singh, P.K., Bains, N.S., Singh, K. ve Sharma, I., (2012). "Multi-Trait and Multi-Environment QTL Analyses for Resistance to Wheat Diseases", *PLoS ONE*, 7(6): e38008.
 - [91] Hongbing, L., Guorong, W., Jinrong, X., Lili, H. ve Kang, Z., (2011). "Identification of wheat proteins with altered expression levels in leaves infected by the stripe rust pathogen", *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6):2423 – 2435.
 - [92] Kav, N.N.V., Srivastava, S., Yajima, W., ve Sharma, N., (2007). "Application of proteomics to investigate plant-microbe interactions", *Curr. Proteomics*, 4: 28–43.
 - [93] Jansen, R.C., Nap, J.P. ve Mlynarova, L., (2002). "Errors in genomics and proteomics", *Nat Biotechnol*, 20:19.
 - [94] Maeda, K., Häggglund, P., Finnie, C. ve Svensson, B., (2006). "Proteomics of Disulphide and Cysteine Oxidoreduction", Finnie, C. (ed.), in: *Plant Proteomics.*, Chapter 4, Blackwell Publishing Ltd, Oxford. *Annual Plant Reviews*.
 - [95] Başaran, E., Aras, S., ve Cansaran-Duman, D., (2010). "Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları", *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67(2): 85-96.

- [96] Park, A.K., (2004). "Proteomic studies in plant", *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 133-138.
- [97] Adessi, C., Miege, C., Albrieux, C., ve Rabilloud, T. (1997). "Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: A current challenge for immobilized pH gradients", *Electrophoresis* 8:127-135.
- [98] Maytalman, D., (2011). "Buğday (*Triticum aestivum* L.) Proteomik Çalışmalarında Yeni Nesil İki Boyutlu Sıvı Kromatografi (2D-LC) Sistemi Kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [99] ATAEE (Ankara Tarım Araştırmaları Enstitüsü), Buğday, <http://www.ataem.gov.tr/tesces.asp?s1=146&s2=37&s3=74&s2b=Bu%F0day>, 31.12.2012.
- [100] Mcneal, F.H., Konzak, C.F., Smith E.P. ve Tate, W.S., (1971). A uniform system for recording and processing creal research data, *USDA*, 34:121.
- [101] Kim, S.T., Cho, K.S., Yu, S., Kim, S.G., Hong, J.C., Han, C.D., Bae, D.W., Myung, A.E. ve Kang, K.Y., (2003). "Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by the rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells", *Proteomics*, 3: 2368–2378.
- [102] Bradford, M.M., (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- [103] Walker, J.M., (2002). *The protein Protocols Handbook*, Second edition, Humana Press.
- [104] Beckman Coulter, (2004). *ProteomLab PF 2D Operator's Manuel*, 175.
- [105] Barre, O. ve Solioz, M., (2006). "Improved protocol for chromatofocusing on the ProteomLab PF2D", *Proteomics*, 6: 5096-5098.
- [106] Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schwiigerer, L., Fotsis, T. ve Mann, M., (1996). "Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry", *Nature*, 379:466-469.
- [107] Wang, X., Wei, L., Chen, X., Tang, C., Dong, Y., Ma, J., Huang, X, Wei, G., Hang, Q., Huang, L. ve Kang, Z., (2010). "Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus evealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction", *BMC Plant Biology*, 10:9.
- [108] Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. ve Schulze-Lefert, P., (2002). "The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene- triggered disease resistance", *Science*, 295: 2073–2076.
- [109] Parmil, K. B., Rashid, A. ve Kitagawa, K., (2004). "Sgt1 Associates with Hsp90: an Initial Step of Assembly of the Core Kinetochore Complex", *Mol. Cell. Biol.*, 24(18): 8069-8079.
- [110] Zhang, S. ve Klessig, D. F., (1997). "Salicylic acid activates a 48-kDa MAP kinase in tobacco", *Plant Cell*, 9: 809–824.

- [111] Doehlemann, G., Berndt, P. ve Hahn, M., (2006). "Different signalling pathways involving a G α protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia", *Molecular Microbiology*, 59(3): 821–835.
- [112] Dreher, K. ve Callis, J., (2007). "Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants", *Ann. Bot.*, 99 (5): 787-822.
- [113] Yamamoto, S., Nakano, T., Suzuki, K. ve Shinshi, H., (2004). "Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1679:279-287.
- [114] van Loon, L.C., Rep, M. ve Pieterse, C.M.J., (2006). "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44: 135–162.
- [115] Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K. ve Park, S.W., (2012). "Plant disease resistance genes: Current status and future directions", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78:51-65.
- [116] Gonzalez, I., Richardson, P.T., Collins, M.D. ve Park, S.F., (1998). "Identification of a gene encoding a methyl-accepting chemotaxis-like protein from *Campylobacter coli* and its use in a molecular typing scheme for campylobacters", *J Appl Microbiol.*, 85(2):317-26.
- [117] Tomich, M., Herfst, C.A., Golden, J.W. ve Mohr, C.D., (2002). "Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*", *Infect Immun.*, 70(4):1799-806.
- [118] Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S. ve Ramphal, R., (1998). "The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion", *Infect. Immun.*, 66:1000–1007.
- [119] Yao, R., Burr, D.H., Doig, P., Trust, T.J., Niu, H. ve Guerry, P. (1994). "Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells", *Mol. Microbiol.*, 14:883–893.
- [120] Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R. and Milton, D.L., (2000). "Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*", *J. Bacteriol.*, 182:2326–2328.
- [121] Tomich, M., Herfst, C.A., Golden, J.W. ve Mohr, C.D. (2002). "Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*", *Infect Immun*, 70:1799–1806.
- [122] Robatzek, S. ve Saijo, Y., (2008). "Plant immunity from A to Z", *Genome Biology*, 9:304-308.
- [123] Peng, M. ve Kuc, J., (1992). "Peroxidase-Generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks", *Phytopathology*, 82: 696-699.
- [124] Nanda, K.A., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N. ve Dunand, C., (2010). "Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions", *Journal of Integrative Plant Biology*, 52: 195-204.

- [125] Heller, J. ve Tudzynski, P., (2011). "Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease", *Annu Rev Phytopathol.*, 49:369-90.
- [126] Giesbert, S., Schurg, T., Scheele, S. ve Tudzynski, P., (2008). "The NADPH oxidase CpNOX1 is required for full pathogenicity of the ergot fungus *Claviceps purpurea*", *Mol. Plant. Pathol.*, 9:317-327.
- [127] Egan, M.J., Wang, Z.Y., Jones, M.A., Smirnoff, N. ve Talbot N.J., (2007) "Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:11772-11777.
- [128] Tenberge, K.B., Beckedorf, M., Hoppe, B., Schouten, A., Solf, M. ve von den Driesch, M., (2002). "In situ localization of AOS in host-pathogen interactions", *Microsc. Microanal.*, 8(2):250–251.
- [129] Dixon, R.A. ve Paiva, N.L., (1995). "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism", *The Plant Cell*, 7:1085-1097.
- [130] Carver, T.L.W, (1998). Pathogenesis and host-parasite interaction in cereal powdery mildew. R.S Singh (Ed.), *Experimental and conceptual plant pathology*, Gordon & Breach, New York.
- [131] Moerschbacher, B.M., Noll, U.M., Flott, B.E. ve Reisener, H.J., (1988). "Lignin biosynthetic enzymes in stem rust resistant and susceptible near-isogenic wheat lines", *Physiol Mol Plant Pathol*, 33:33–46.
- [132] Moerschbacher, B.M., Noll, U.M., Gorrichon, L. ve Reisener, H.J., (1990). "Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust", *Plant Physiol*, 93:465–470.
- [133] Burrell, M.M. ve Rees, T., (1974). "Carbohydrate metabolism of rice leaves infected by *Pyricularia oryza*", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 4:489–496.
- [134] Mendoza-Rodríguez, M., Portal, O., Ocaña, B., Acosta-Suárez, M., Roque, B., Höfte, M. ve Jiménez, E. (2010). "Expression analysis of three phenylpropanoid-related genes during *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis* interaction and in response to ethephon", *Biotechnología Vegetal*, 4: 229 – 236.
- [135] Beliën, T., Van Campenhout, S., Van Acker, M. ve Volckaert, G., (2005). "Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327: 407-414.
- [136] Dean, J.F.D., Gamble, H.R. ve Anderson, J.D., (1989). "The ethylene biosynthesis inducing xylanase: its induction in *Trichoderma viride* and certain plant pathogens", *Phytopathology*, 79:1071–1078.
- [137] Ruiz-Roldán, M.C., Di Pietro, A., Huertas-González, M.D. ve Roncero, M.I.G., (1999). "Two xylanase genes of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* are differentially expressed during infection of tomato plants", *Molecular and General Genetics*, 261(3): 530 – 536.

- [138] Coll, N., Epple, P., ve Dangl, J., (2011). "Programmed cell death in the plant immune system", *Cell Death Differ.*, 18:1247-1256.
- [139] Kitanaka, C., ve Kuchino, Y. (1999). "Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology", *Cell Death Differ.*, 6:508.
- [140] Kroemer, G., ve Martin, S.J., (2005). "Caspase-independent cell death", *Nat. Med.*, 11:725-730.
- [141] Van Baarlen, P., Woltering, E.J., Staats, M., ve Van Kan, J.A.L., (2007). "Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control", *Mol. Plant Pathol.*, 8:41-54.
- [142] Coll, N. S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J. L., ve Epple, P., (2010). "Arabidopsis type I metacaspases control cell death", *Science*, 330:1393.
- [143] Watanabe, N., ve Lam, E., (2011). "Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses", *Plant J.*, 66:969-982.
- [144] Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K.U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N.H. ve Marco, Y., (2003). "ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt", *Plant J.*, 36:353–365.
- [145] Llorente, F., Alonso-Blanco, C., Sanchez-Rodriguez, C., Jorda, L. ve Molina, A. (2005). "ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*", *Plant J.*, 43:165–180.
- [146] Feuillet, C., Travella, S., Stein, N., Albar, L., Nublat, A. ve Keller, B., (2003). "Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome", *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:15253-15258.
- [147] Huanbin, Z., Shaofang, L., Zhiyong, D., Xianping, W., Tao, C., Jinsong, Z., Shouyi, C., Hongqing, L., Aimin, Z., Daowen, W. ve Xiangqi, Z., (2007). "Molecular analysis of three new receptor-like kinase genes from hexaploid wheat and evidence for their participation in the wheat hypersensitive response to stripe rust fungus infection", *The Plant Journal*, 52:420-434.
- [148] von Röpenack, E., Parr, A. ve Schulze-Lefert, P., (1998). "Structural analysis and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley", *J. Biol. Chem.*, 273:9013–9022.
- [149] Miyagawa, H., Ishihara, A., Nishimoto, T., Ueno, T. ve Mayama, S., (1995). "Induction of avenanthramides in oat leaves inoculated with crown rust fungus, *Puccinia coronata* f. sp. *Avenae*", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59:2305–2306.

- [150] Peipp, H., Maier, W., Schmidt, J., Wray, V. ve Strack, D., (1997). "Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots", *Phytochemistry*, 44:581–587.
- [151] Kader, J.C., (1996). "Lipid-transfer proteins in plants", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:627–54.
- [152] van Loon, L.C., Rep, M., Pietersen, C.M.J., (2006) "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants", *Annual Review of Phytopathology*, 44:135-162.
- [153] El-Bebany, A.F., Rampitsch, C. ve Daayf, F., (2010). "Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborne fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness", *Proteomics*, 10:289–303.
- [154] Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. ve Ausubel, F. M., (2001). "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence", *Nature*, 414:562–565.
- [155] Soanes, D.M., Alam, I., Cornell, M. ve Wong, H.M., (2008). "Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis", *PLoS ONE*, 3: e2300.
- [156] Wang, X., El Hadrami, A., Adam, L. R. ve Daayf, F., (2008). "Differential activation and suppression of potato defence responses by *Phytophthora infestans* isolates representing US-1 and US-8 genotypes", *Plant Pathol.*, 57:1026–1037.
- [157] Shibuya, N., ve Minami, E., (2001). "Oligosaccharide signalling for defence responses in plant", *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59: 223–233.
- [158] Boller, T., (1995). "Chemoperception of microbial signals in plant cells", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 189–214.
- [159] Peck, S.C., Nuhse, T.S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F., ve Boller, T. (2001). "Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors", *Plant Cell*, 13: 1467–1475.
- [160] Girhepuje, P.V. ve Shinde, G.B., (2011). "Transgenic tomato plants expressing a wheat endochitinase gene demonstrate enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105:243 – 251.
- [161] Antoniwi, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S. ve van Loon, L.C., (1980). "Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV", *Journal of General Virology*, 47: 79-87.
- [162] Cornelissen, B.J.C., Horowitz, J., van Kan, J.A.L., Goldberg, R.B. ve Bol, J.F., (1987). "Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group", *Nucleic Acids Res.*, 15:6799–811.

- [163] Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. ve Mosinger, E., (1995). "Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*)", *Plant Physiol*, 108:17–27.
- [164] Edreva, A., (2005). "Pathogenesis-related proteins. Research progress in the last 15 years", *General and Applied Plant Physiology*, 31:105–124.
- [165] Caruso, C., Caporale, C., Poerio, E., Facchiano, A. ve Buonocore, V., (1993). "The amino acid sequence of a protein from wheat kernel closely related to proteins involved in the mechanism of plant defence", *J. Protein Chem.*, 12 : 379/386.
- [166] Caruso, C., Bertini, L., Tucci, M., Caporale, C., Nobile, M. ve Leonardi, L., Buonocore, V., (2001). "Recombinant wheat antifungal PR4 proteins expressed in *Escherichia coli*", *Protein Exp. Purif.*, 23:380-388.
- [167] Caruso, C., Nobile, M., Leonardi, L., Bertini, L., Buonocore, V. ve Caporale, C., (2001). "Isolation and amino acid sequence of two new PR-4 proteins from wheat", *J. Protein Chem.*, 20:327-335.
- [168] Ryals, J., Ward, E., ve Métraux, J.-P., (1992). Systemic acquired resistance: An inducible defense mechanism in plants. In *Inducible Plant Proteins, Their Biochemistry and Molecular Biology*, J.L. Wray, ed Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- [169] Hammond-Kosack, K.E. ve Jones, J.D.G., (1996). "Resistance gene-dependent plant defense responses", *Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- [170] Molina, A., Gorlach, J., Volrath, S. ve Ryals, J., (1999). "Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance", *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12 : 53-58.
- [171] Manickavelu, A., Kawaura, K., Oishi, K., Shin-I, T., Kohara, Y., Yahiaoui, N., Keller, B., Suzuki, A., Yano, K. ve Ogihara, Y., (2010). "Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines in common wheat infected by *Puccinia triticina*", *DNA Research*, 17:211–222.
- [172] Knepper, C. ve Day, B., (2010). From perception to activation: the molecular-genetic and biochemical land scape of disease resistance signalling in plants In: Last R (ed) *The Arabidopsis Book* 8, 1st edn. NW, Washington.
- [173] Maytalman, D., Mert, Z., Baykal, A.T., Inan, C., Günel, A. ve Hasançebi, S., (2013). "Proteomic analysis of early resistance response in wheat to yellow rust using ProteomeLab PF2D", *PlantOmics*, 6(1): 24-35.
- [174] Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., (2006). "Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks", *Curr Opin Plant Biol*, 9:436–42.

- [175] Dure, L. (1993). "A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation", *Plant J.*, 3:363–369.
- [176] Faïçal, B., Akiko, Y., Lobna, J., Shin, T., Tokunori, H., Huy, Q.D., Tsukahara, H., Khaled, M. ve Moez, H. (2011) Pleiotropic Effects of the Wheat Dehydrin DHN-5 on Stress Responses in Arabidopsis", *Plant Cell Physiol*, 52(4): 676-688.
- [177] De Meutter, J., Robertson, L., Parcy, F., Mena, M., Fenoll, C. ve Gheysen, G., (2005). "Differential activation of ABI3 and LEA genes upon plant parasitic nematode infection", *Mol Plant Pathol*, 6: 321–325.
- [178] Goyal, K., Walton, L.J. ve Tunnacliffe, A., (2005). "LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress", *Biochem J*, 388: 151–157.
- [179] Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F. ve Covarrubias, A.A., (2008). "The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins", *Plant Physiol*, 148: 6–24.
- [180] Nakajima, T. ve Abe, J., (2002). "Environmental factors affecting expression of resistance to pink snow mold caused by *Microdochium nivale* in winter wheat", *Can. J. Bot.*, 74:1783–1788.
- [181] Singh, S., Cornilescu, C.C., Tyler, R.C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Lee, M.S., Markley, J.L., (2005). "Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein", *Protein Sci*, 14: 2601–2609.
- [182] Yazhou, Y., Mingyang, H., Zigu, Z., Shuxiu, L., Yan, X., Chaohong, Z., Stacy, D.S. ve Yuejin, W., (2012). "Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress", *BMC Plant Biology*, 12:140.
- [183] Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. ve Langebartels, C., (1998). "Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions", *Trends in Plant Science*, 3: 47–50.
- [184] Ying-Hui, D., Jun, G., Ke, D., Shu-Juan, W., Hong, Z., Xi-Wei, D., Yue-Ying, C., Francine, G., Li-Li, H. ve Zhen-Sheng, K., (2011). "Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses", *Molecular Biology Reports*, 38 (1):301 – 307.
- [185] Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H., Terauchi, R., (2003). "Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*", *Mol Plant Pathol*, 4:383–391.
- [186] Mohapatra, B., Ahmad, G., Nadeau, S., Zutshi, N., An, W. ve Scheffe, S. (2013). "Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: Critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases", *Biochim Biophys Acta*, 1833:122–139.
- [187] Dang, W., Zhang, M. ve Sun, L., (2011). "Edwardsiella tarda DnaJ is a virulence-associated molecular chaperone with immunoprotective potential", *Fish Shellfish Immunol*, 31:182-188.

- [188] Wall, D., Zylicz, M. ve Georgopoulos, C., (1994). "The N-terminal 108 amino acids of the E. coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lamda replication", J Biol Chem, 269:5446–51.
- [189] Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. ve Cobb, M.H., (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions", Endocr. Rev., 22 (2): 153–83.
- [190] Garrido, E., Voß, U., Müller, P., Castillo-Lluva, S., Kahmann, R. ve Pérez-Martin, J., (2004). "The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein", Genes and Development, 18:3117-3130.
- [191] Xu, J.R., Staiger, C.J. ve Hamer, J.E., (1998). "Inactivation of the mitogen-activated protein kinase MPS1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:12713-12718.
- [192] Hu, G., Kamp, A., Linning, R., Naik, S. ve Bakkeren, G., (2007). "Complementation of *Ustilago maydis* MAPK mutants by a wheat leaf rust, *Puccinia triticina* homolog: potential for functional analyses of rust genes", Mol. Plant-Microbe Interact., 20:637-647.
- [193] Jaillais, Y., ve Chory, J., (2010). "Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration", Nat. Struct. Mol. Biol., 17:642–645.
- [194] Yang, T. ve Poovaiah, B.W., (2003). "Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants", Trends in plant science, 8(10):505-512.
- [195] Goldschmidt-Glermont, P. J. ve Kim, J. W., (1991). "Regulation of phospholipaseC-1 by profilin and tyrosinephosphorylation", Science, 251:1231–1233.
- [196] Song, X., Rampitsch, C., Soltani, B., Mauthe, W.R., Linning, R., Banks, T.W., McCallum, B.D. ve et Bakkeren, G., (2011). "Proteome analysis of wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*, infection structures enriched for haustoria", Proteomics, 11(5):944-963.
- [197] Takai, Y., Sasaki, T. ve Matozaki, T., (2001). "Small GTP-binding proteins", Physiol. Rev., 81.
- [198] Yang, Z., (2002). "Small GTPases: versatile signaling switches in plants", Plant Cell, 14.
- [199] Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S. ve Masle, J. (2008). "Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana*", The Plant Cell, 20: 3430–3447
- [200] Sage-Ono, K., Ono, M., Harada, H., ve Kamada, H., (1998). "Darkinduced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis*", Plant Cell Physiol., 39:357–360.
- [201] DeLille, J.M., Sehnke, P.C. ve Ferl, R.J., (2001). "The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators", Plant Physiol., 126:35–38.

- [202] Brandt, J., Thordal-Christensen, H., Vad, K., Gregersen, P.L., ve Collinge, D.B., (1992). "A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator", *The Plant Journal*, 2: 815-820.
- [203] Caplan, J.L., Zhu, X., Mamillapalli, P., Maranhe, R., Anandalakshmi, R., ve Dinesh-Kumar, S.P., (2009). "Induced ER chaperones regulate a receptor-like kinase to mediate antiviral innate immune response in plants", *Cell Host Microbe*, 6:457-469.
- [204] Ray, S., Anderson, J.M., Urmeev, F.I. ve Goodwin, S.B., (2003). "Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*", *Plant Mol Biol*, 53:741-754.
- [205] Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L. ve Keller, B., (2009). "A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat", *Science*, 323:1360-1363.
- [206] Pugsley, A., (1993). "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria", *Microbiol. Rev.*, 57:50-108.
- [207] Stathopoulos, C., Hendrixson, D.R., Thanassi, D.G., Hultgren, S.J., St. Geme III, J.W. ve Curtiss III, R., (2000). "Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story", *Microbes Infect.*, 2:1061-1072.
- [208] Thanassi, D.G., Saulino, E.T. ve Hultgren, S.J., (1998). "The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway", *Curr. Opin. Microbiol.*, 1:223-231.
- [209] Yeung, I.Y., Phillips, E., Mann, D.A. ve Barton, C.H., (2004). "Oxidant regulation of the bivalent cation transporter *Nramp1*", *Biochem Soc Trans.*, 32(6):1008-10.
- [210] Büyükgüzel, K., (2000). "Ökaryotlardaki Transkripsiyonu Düzenleyici Proteinler", *Türk J Biol*, 24:521-531.
- [211] Martin, R.G. ve Rosner, J.L., (2001). "The *AraC* transcriptional activators", *Current Opinion in Microbiology*, 4(2):132-137.
- [212] Muessig, C., Schroder, F., Usadel, B. ve Liss, J., (2010). "Structure and putative function of NFX1-like proteins in plants", *Annu Rev Plant Biol*, 12(3):381-94.
- [213] Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C.K., Wildermuth, M.C., (2010). "Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1):460-5.
- [214] Mehrabi, R., Ding, S. ve Xu, J.R., (2008). "MADS-Box Transcription Factor *Mig1* Is Required for Infectious Growth in *Magnaporthe grisea*", *Eukaryot Cell*, 7: 791-799.

- [215] Zhao, T., Ni, Z., Dai, Y., Yao, Y., Nie, X. ve Sun, Q., (2006). "Characterization and expression of 42 MADS-box genes in wheat (*Triticum aestivum* L.)", *Mol Gen Genomics*, 276: 334-350.
- [216] Santos, J.M., Freire, P., Vicente, M. ve Arraiano, C., (1999). "The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth", *Mol. Microbiol.*, 32:789-798.
- [217] Huh, S.U., Kim, K.J. ve Paek, K.H., (2012). "Capsicum annuum basic transcription factor 3 (CaBtf3) regulates transcription of pathogenesis-related genes during hypersensitive response upon Tobacco mosaic virus infection", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(2): 910–917.
- [218] Essmann, J., Bones, P., Weis, E. ve Scharte, J., (2008). "Leaf carbohydrate metabolism during defense: Intracellular sucrose-cleaving enzymes do not compensate repression of cell wall invertase", *Plant Signal Behav.*, 10:885-7.
- [219] Berger, S., Sinha, A.K. ve Roitsch, T., (2007). "Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions", *J. Exp. Bot.*, 58:4019–4026.
- [220] Berger, S., Benediktyova, Z., Matous, K., Bonfig, K., Mueller, M. J., Nedbal, L., ve Roitsch, T., (2007). "Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: Differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*", *J. Exp. Bot.*, 58:797-806.
- [221] Horst, R.J., Engelsdorf, T., Sonnewald, U., ve Voll, L.M., (2008). "Infection of maize leaves with *Ustilago maydis* prevents establishment of C4 photosynthesis", *J. Plant Physiol.*, 165:19-28.
- [222] Manter, D.K., Kelsey, R.G., ve Karchesy, J.J., (2007). "Photosynthetic declines in *Phytophthora ramorum*-infected plants develop prior to water stress and in response to exogenous application of elicitors", *Phytopathology*, 97:850-856.
- [223] Tremblay, A., Hosseini, P., Alkharouf, N.W., Li, S. ve Matthews, B.F., (2010). "Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection", *Plant Science*, 179(3):183–193.
- [224] İstanbul Üniversitesi Ders Notları, Enerji dönüşümü: Mitokondri ve kloroplastlarda enerji metabolizması, <http://www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1260191195.pdf>, 14.02.2013.
- [225] Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H. ve Nakayama, K., (2000). "A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin comigratory protein (Bcp)", *Biochem J*, 351:107-114.
- [226] Santos, C.V. ve Rey, P., (2006). "Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response", *Trends in Plant Science*, 11(7):329-334.
- [227] Abbink, T.E.M., Peart, J.R., Mos, T.N.M., Baulcombe, D.C., Bol, J.F. ve Linthorst, H.J.M., (2002). "Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances viral replication in plants", *Virology*, 295:307–319.

- [228] Xin, M., Wang, X., Peng, H., Yao, Y., Xie, C., Han, Y., Ni, Z. ve Sun, Q., (2012). "Transcriptome Comparison of Susceptible and Resistant Wheat in Response to Powdery Mildew Infection. Genomics", Proteomics & Bioinformatics, 10(2): 94-106.
- [229] Clarke, A.K., (1999). "ATP-dependent Clp proteases in photosynthetic organisms – a cut above the rest!", Ann Bot, 83:593-599.
- [230] Ryan, C.A., (1990). "Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens", Annu. Rev. Phytopathol, 28: 425-449.
- [231] Hamel, F., Breton, C. ve Houde, M., (1998). "Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor", Planta, 205: 531-538.
- [232] Tremblay, A., Hosseini, P., Alkharouf, N.W., Li, S. ve Matthews, B.F., (2010). "Transcriptome analysis of a compatible response by Glycine max to Phakopsora pachyrhizi infection", Plant Science, 179(3): 183–193.
- [233] Snowden, K.C. ve Gardner, R.C., (1993). "Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots", Plant Physiol, 103: 855-861.
- [234] Tian, M., Chaudhry, F., Ruzicka, D.R., Meagher, R.B., Staiger, C.J. ve Day, B., (2009). "Arabidopsis actin-depolymerizing factor AtADF4 mediates defense signal transduction triggered by the *Pseudomonas syringae* effector AvrPphB", Plant Physiol, 150: 815-824.
- [235] Gözükar, E.M., (2001). Biyokimya, 1, 4, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Yahya Emin DEMİRCİ
Doğum Tarihi ve Yeri : 30.08.1986 – Fatih/İSTANBUL
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : yemin_34@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Bitki Koruma	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2009
Lise	Fen Bilimleri	YDA İzzet Ünver Lisesi	2004

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2009-2012	Buğday Ekolojik Yaşamı Destekleme Derneği	Ziraat Mühendisi
2011-2012	Buğday Ekolojik Yaşamı Destekleme Derneği	Proje Yürütücüsü Ziraat Mühendisi

YAYINLARI

Bildiri

1. **Yahya Emin Demirci**, Cihan İnan, Zafer Mert, Ahmet Tarık Baykal, Aslıhan Günel, Şenay Vural Korkut, Semra Hasaebi. Proteomic investigation of compatible interaction between wheat and yellow rust. 15th European Biotechnology Congress, Istanbul.(poster)
2. **Yahya Emin Demirci**, Cihan İnan, Zafer Mert, Ahmet Tarık Baykal, Aslıhan Günel, Şenay Vural Korkut, Semra Hasaebi. Hassas Yerel Buğday (*Triticum aestevum*) Çeşidi Seri82’de Sarı Pas Enfeksiyonu Gelişiminin Proteom Düzeyinde İncelenmesi, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya.(sunum)
3. Semra Hasaebi, Dilara Maytalman, Cihan İnan, **Yahya Emin Demirci**, Zafer Mert, Tarık Baykal, Aslıhan Günel. Identification of Early Response Proteins in Compatible and Incompatible Interaction Between Wheat and Stripe Rust. International Conference Plant Disease and Resistance Mechanism, p: 80, 20-22 February 2013, Vienna-Austria.(poster)

Proje

1. Buğdayda Sarı Pas Hastalığı Dayanıklılık Mekanizmasının Yeni Nesil İki-Boyutlu Sıvı Kromatografi Sistemi Kullanılarak Proteom Düzeyinde İncelenmesi (Bursiyer Öğrenci)