

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ERWINIA AMYLOVORA* EAKKB29 İZOLATININ HARPİN GENİNİN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE ALTINDANE EKMEKLİK BUĞDAY
(*TRITICUM AESTIVUM* L.) FİDELERİ ÜZERİNDE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve BEKTAŞ

OCAK 2017
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Erwinia amylovora* EAKKB29 İzolatının Harpin Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Altındane Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Fideleri Üzerinde Etkilerinin Araştırılması” konulu bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında Yüksek Lisans çalışması olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve değerli jüri üyesi hocalarıma teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarında yardımlarıyla bana destek olan K.T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarının tüm çalışanlarına, çalışmalarımın bir kısmını laboratuvarlarında gerçekleştirdiğim ve benden yardımlarını esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na, Doç. Dr. Aykut SAĞLAM’a ve tüm K.T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı çalışanlarına, araştırma konumda bana yardımcı olan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Cüneyt AKI’ya ve çalışmamda kullandığım *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisini temin ettiğim Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji ABD Öğretim Üyesi Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ’a teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca tez yazımında bana destek olan hocam Yrd. Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’e çok teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren, bana inanan ve her zaman varlıklarıyla bana güç veren sevgili babam Okan BEKTAŞ’a, saygı değer annem Ayşegül BEKTAŞ’a, maddi manavi desteklerini esirgemeyen çok sevgili büyüklerim Ali BEKTAŞ, Mevlüde BEKTAŞ, Yılmaz ARAZ ve Müzeyyen ARAZ’a ve kardeşim Furkan BEKTAŞ’a çok teşekkür ederim. Ayrıca yine her zor anımda yanımda olan arkadaşlarım Esra GÜLDEN, Aysun ADIGÜZEL ve Orkun HAVAYIOĞLU’na ve diğer bütün dostlarıma teşekkür ederim.

Merve BEKTAŞ
Trabzon 2017

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Erwinia amylovora* EAKKB29 İzolatının Harpin Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Altındane Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Fideleri Üzerinde Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.13/01/2017

Merve BEKTAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Harpin Proteini	4
1.3. Harpin'in Etki Mekanizması	5
1.4. Harpin Proteininin Bitki Büyümesi Üzerine Etkisi	6
1.5. Harpin Proteini İçeren Messenger®'ın Toksikolojik Profili.....	7
1.6. Çalışmanın Amacı	8
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	10
2.1. Besiyeri ve Kimyasallar	10
2.2. Mikroorganizmalar, Plazmitler ve Bitkiler	10
2.2.1. Mikroorganizmalar	11
2.2.1.1. <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29	11
2.2.1.2. <i>Escherichia coli</i> JM101	11
2.2.1.3. <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	11
2.2.2. Plazmitler.....	11
2.2.2.1. pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü.....	11
2.2.2.2. pET-20b(+) Ekspresyon Vektörü	12
2.2.2.3. pET-28(a) Ekspresyon Vektörü.....	12
2.2.3. Bitki	13
2.2.3.1. <i>Triticum aestivum</i>	13
2.3. Moleküler Çalışmalar	13

2.3.1.	Genomik DNA İzolasyonu	13
2.3.2.	Primer Sentezi	14
2.3.3.	<i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 <i>hrpN</i> Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi.....	15
2.3.4.	<i>hrpN</i> Geninin pET-20b(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspres Edilmesi.....	15
2.3.5.	<i>hrpN</i> Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspres Edilmesi.....	16
2.3.6.	Harpin Proteininin Saflaştırılması	17
2.3.6.1.	Ni-Affinite Kromatografi Yöntemi ile Saflaştırma.....	17
2.3.6.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi.....	18
2.4.	Bitki Uygulamaları	18
2.4.1.	Bitkilerin Temini ve Büyütülmesi.....	18
2.4.2.	Analiz ve Ölçümler	19
3.	BULGULAR	20
3.1.	<i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 <i>hrpN</i> Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	20
3.2.	<i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 <i>hrpN</i> Geninin pET-20b(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu	22
3.3.	<i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 <i>hrpN</i> Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu	26
3.4.	Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması.....	29
3.4.1.	Ni-Affinite Kromatografi Yöntemi ile Saflaştırma.....	29
3.4.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi.....	30
3.5.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	30
3.6.	Bitki Uygulamaları	31
3.6.1.	Bitkilerin Büyütülmesi	31
3.6.2.	Analiz ve Ölçümler	32
3.6.2.1.	HrpN(<i>Ea</i>)E ve HrpN(<i>Ea</i>)E-His Proteinlerinin Bitkinin Yaş Ağırlığı, Kuru Ağırlığı, Yaprak Uzunluğu ve Kök Uzunluğuna Etkisi	34
3.6.2.2.	HrpN(<i>Ea</i>)I ve HrpN(<i>Ea</i>)I-His Proteinlerinin Bitkinin Yaş Ağırlığı, Kuru Ağırlığı, Yaprak Uzunluğu ve Kök Uzunluğuna Etkisi	39
4.	TARTIŞMA.....	45
5.	SONUÇLAR	51
6.	ÖNERİLER	53
7.	KAYNAKLAR.....	56
8.	EKLER	59

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

ERWINIA AMYLOVORA EAKKB29 İZOLATININ HARPİN GENİNİN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE ALTINDANE EKMEKLİK BUĞDAY
(*TRITICUM AESTIVUM* L.) FİDELERİ ÜZERİNDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve BEKTAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2017, 58 Sayfa, 1 Ek Sayfa

Harpin doğal olarak meydana gelen bakteriyel içerikli bir proteindir. Bitkinin doğal savunma mekanizmasını harekete geçiren harpin, ilk defa bakteriyel patojen olan *Erwinia amylovora*'dan izole edilmiştir.

Bu çalışmada, *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* geninin klonlanmasını, gen ürününün izolasyonunu ve *Triticum aestivum* bitkisi üzerine etkilerini konu almaktadır. *hrpN* geninin 1200 nt' lik baz dizini belirlenerek, pET-28a(+) ve pET-20b(+) vektörlerine klonlandı. Gen, *E.coli* BL21 hücrelerinde, ekspres edildi ve saflaştırıldı. Harpin proteininin moleküler ağırlığı 40 kDa olarak tespit edildi. Saflaştırılan HrpN(*Ea*)E, HrpN(*Ea*)E-His, HrpN(*Ea*)I ve HrpN(*Ea*)I-His proteinlerinin *Triticum aestivum* bitkisinin yaprak ve kök uzunluğuna, bitkinin kuru ve yaş ağırlığına etkileri araştırıldı. HrpN(*Ea*)I proteininin *Triticum aestivum* bitkisinde en iyi etkiyi gösterdiği belirlendi. *Triticum aestivum* fideleri üzerine en etkili konsantrasyonun 300 µl (4,5 µg) olduğu, 900 µl (13,5 µg)' den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Aktivatör, Harpin, *Triticum aestivum* L., *Erwinia amylovora* EAKKB29

Master Thesis

SUMMARY

CLONING, EXPRESSION OF HARPIN GENE FROM A *ERWINIA AMYLOVORA*
EAKKB29 ISOLATE AND STUDYING ITS EFFECT ON WHEAT (*TRITICUM*
AESTIVUM L.) SEEDLINGS

Merve BEKTAŞ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2017, 58 Pages, 1 Appendix Pages

Harpin, occurred naturally, is a bacterial based protein. Harpin, which mobilizes the natural defense mechanism of the plant, has been isolated from bacterial pathogen *Erwinia amylovora*.

This study is about cloning of *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* gene, isolation of its gene product and its effects on *Triticum aestivum* plant. Having defined the base sequencing of 1200 nt gene, which coding *hrpN* gene, was cloned to pET-28a(+) and pET-20b (+) vectors. Clones were transformed to *E.coli* BL21, and expression was performed and Harpin protein was purified. The molecular weight of Harpin protein was determined as 40 kDa, effects of purified HrpN(*Ea*)E, HrpN(*Ea*)E-His, HrpN(*Ea*)I and HrpN(*Ea*)I-His proteins on leaf length, root length, dry weight and wet weight of *Triticum aestivum* shoots were studied. HrpN(*Ea*)I was found the most effective one. The most effective concentration of it was determined as 300µl (4,5 µg). Over 900 µl (13,5 µg) applications have reducing effects on studied parameters.

Key Works: Activator, Harpin, *Triticum aestivum* L., *Erwinia amylovora* EAKKB29

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. pGEM-T Easy vektörünün haritası	12
Şekil 2. Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pET-20b(+) haritası.....	12
Şekil 3. Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pET-28a(+) haritası.....	13
Şekil 4. <i>E.amylovora</i> EAKKB29'nın <i>hrpN</i> genini içeren PCR ürünleri	21
Şekil 5. <i>hrpN</i> genini içeren pGEM-T Easy klonlama vektörünün <i>EcoRI</i> ile kesimi	22
Şekil 6. <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29'nın genomik DNA'sının kalıp olarak kullanılması ile elde edilen PCR ürünlerinin görüntüleri.	24
Şekil 7. pET-20b(+) klonu ve kontrol kesim ürünü.....	25
Şekil 8. <i>hrpN</i> genini içeren PCR ürünleri	28
Şekil 9. p28hrpN(<i>Ea</i>) ve p28hrpN(<i>Ea</i>)-His plazmitleri ve kontrol kesimleri.....	29
Şekil 10. pET-28a(+) vektörüne klonlanıp, kısmen saflaştırılan rekombinant <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 harpin proteininin SDS-PAGE analizi	30
Şekil 11. pET-20b(+) vektörüne klonlanıp, kısmen saflaştırılan rekombinant <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 harpin proteininin SDS-PAGE analizi	31
Şekil 12. Buğday (<i>Triticum aestivum</i>) fidelerinin uygulamadan önceki hali.....	32
Şekil 13. Yaprak uzunluğu ölçümü için hazırlanmış buğday fideleri.....	32
Şekil 14. Kök uzunluğu ölçümü için hazırlanmış buğday fideleri.....	33
Şekil 15. Bitkinin toplam (kök ve yaprak) yaş ağırlık ölçümü için hazırlanmış buğday fideleri	33
Şekil 16. Bitkinin toplam (kök ve yaprak) kuru ağırlık ölçümü için hazırlanmış buğday fideleri	34
Şekil 17. Harpin proteini içeren konsantre edilmiş ekstraselüler bakteri ekstraktlarının <i>T.aestivum</i> fidelerinin kök uzunlukları üzerine etkileri	35
Şekil 18. Harpin proteini içeren konsantre edilmiş ekstraselüler bakteri ekstraktlarının <i>T.aestivum</i> fidelerinin yaprak boyları üzerine etkileri	36
Şekil 19. Harpin proteini içeren konsantre edilmiş ekstraselüler bakteri ekstraktlarının <i>T.aestivum</i> fidelerinin yaş ağırlıkları üzerine etkileri	37
Şekil 20. Harpin proteini içeren konsantre edilmiş ekstraselüler bakteri ekstraktlarının <i>T.aestivum</i> fidelerinin kuru ağırlık üzerine etkileri	38
Şekil 21. Kısmen saflaştırılmış intraselüler harpin proteininin <i>T.aestivum</i> kök uzunlukları üzerine etkileri	40
Şekil 22. Kısmen saflaştırılmış intraselüler harpin proteininin <i>T.aestivum</i> yaprak boyları üzerine etkileri.....	41

Şekil 23. Kısmen saflaştırılmış intraselüler harpin proteininin <i>T.aestivum</i> yaş ağırlık üzerine etkileri.....	42
Şekil 24. Kısmen saflaştırılmış intraselüler harpin proteininin <i>T.aestivum</i> kuru ağırlık üzerine etkileri.....	43
Şekil 25. En yüksek etkiyi gösteren HrpN(<i>Ea</i>)I proteininin farklı miktarlarının bitki yaprak ve kök boyuna etkisi.....	44



TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>hrpN</i> genini çoğaltmak ve klonlamak için kullanılan primerler	14
Tablo 2. <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 bakterisine ait <i>hrpN</i> geninin tespiti için HrpNF ve HrpNR primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR şartları.....	20
Tablo 3. <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 Genomik DNA'sı için PCR protokolü	21
Tablo 4. <i>E.amylovora</i> EAKKB29'nın <i>hrpN</i> genini içeren PCR ürünlerinin pGEM -T Easy klonlaması için ligasyon bileşenleri.....	22
Tablo 5. <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 <i>hrpN</i> geninin amplifikasyonu ve pET-20b(+) 'ye klonlanması için oluşturulan PCR şartları.....	23
Tablo 6. <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 <i>hrpN</i> geninin pET-20b(+) 'ye klonlanması için oluşturulan PCR'ın çalışma programı	24
Tablo 7. pET-20b(+) klonlama vektörüne ligasyon için kullanılan şartlar	25
Tablo 8. <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 <i>hrpN</i> geninin amplifikasyonu ve pET-28a(+) 'ya klonlanması için oluşturulan PCR şartları.....	27
Tablo 9. <i>Erwinia amylovora</i> EAKKB29 <i>hrpN</i> geninin pET-28a(+) vektörüne klonlanması için gerçekleştirilen PCR programı.....	27
Tablo 10. pET-28a(+) klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar	28

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

Amp	: Ampisilin
<i>BamHI</i>	: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
cm	: Santimetre
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dk	: Dakika
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRI</i>	: <i>Escherichia coli</i> RY13
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPA	: Environmental Protection Agency
EtBr	: Etidyum Bromür
g	: Gram
<i>HindIII</i>	: <i>Haemophilus influenzae</i> Rd
His-Tag	: Histidin Kuyruğu
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyo galaktopiranosid
Kan	: Kanamisin
kDa	: Kilodalton
KOH	: Potasyum Hidroksit
LB	: Luria-Bertoni Broth
LBA	: Luria-Bertoni Broth Agar
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
<i>NcoI</i>	: <i>Nocardia corallina</i>
nm	: Nanometre
Nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pH	: Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SAR	: Savunma Mekanizması
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sn	: Saniye
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Biyolojik mücadelenin tarihi gelişim süreci incelendiğinde, başlangıç dönemi, yoğun çalışma dönemi ve modern dönem olmak üzere karşımıza üç dönem ortaya çıkmaktadır. Başlangıç dönemi, M.Ö başlayıp, 17.yy'la kadar olan süreyi kapsar. Yoğun çalışma dönemi, özellikle 17., 18. ve 19.yy' ları kapsayan, yoğun araştırmaların yapıldığı dönemdir. Modern dönem ise kimyasalların zararlı etkilerinin anlaşılmaya başlandığı ve moleküler biyoloji tekniklerinin kullanıldığı 1960'lı yıllardan sonrasını içermektedir (Demirbağ ve ark., 2008). Biyolojik mücadele, diğer mücadele yöntemlerine göre, doğal dengenin korunmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai hedefe ulaştırabilmesi bakımından çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir. Çevreye duyarlı, hedefe özgü etkiye sahip olması, besin, su ve çevre kirliliği oluşturmaması, kullanıcının toksik pestisitlere maruz kalmasının önlenmesi, yan etkilerinin olmaması, diğer yöntemlere nazaran daha uzun zaman periyodu boyunca etkili olması, uygulamasının kolay ve ekonomik olarak kazançlı olması, biyomücadelenin tercih sebeplerindedir.

Uzun süredir uygulanan kimyasal mücadele sonucu ortaya çıkan ciddi sorunlardan dolayı alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Yoğun kimyasal kullanımı sonucunda doğal denge tahrip olmuş, çevre ve insan sağlığı her geçen gün biraz daha tehdit altına girmiştir. Tüm bu sorunlar karşısında çevre ile dost, uzun süre etkili bir mücadele yöntemi olarak biyolojik kontrol ön plana çıkmıştır. Sürdürülebilir üretim açısından biyolojik mücadele kaçınılmaz hale gelmiştir (Şeniz ve ark., 2005).

Mikrobiyal mücadele biyolojik mücadelenin bir alt dalı olmakla birlikte, tarım ve ormancılıkta zarar oluşturan bir organizmanın zararlı etkisinin mikroorganizmalar veya mikroorganizmaların ürünleri kullanılarak ortadan kaldırılma işlemidir (Demirbağ ve ark., 2008). Mikroorganizmalar, biyolojik mücadelede büyük önem taşımaktadır.

Pestisit kullanımının söz konusu olmadığı biyolojik mücadelede, kültürel önlemlerin desteğiyle sağlıklı bir çevre oluşturmak, pestisitlerin yerine bitki bakım maddeleri ile bitkinin

doğal dayanıklılığını arttırıcı maddeleri kullanıp hastalık etmenlerini ve zararlıları kontrol altında tutmak amaçlanmıştır. Zararlıların kontrol altında tutulmasında biyolojik m¼cadelede, yararlı faunanın korunmasına b¼y¼k ¼nem verir.

G¼n¼m¼ze kadar tarımsal ¼retimde bitki hastalıklarına karşı iki ana korunma y¼ntemi kullanılmaktaydı. Bunlardan ilki, dayanıklı ¼eřit, doğru g¼breleme ve uygun yetiştirme tekniklerinin se¼imi gibi k¼lt¼rel y¼ntemler, diğerleri ise fungusitlerin kullanımıyla hastalıkların ¼nlenmesiydi. Bitki sağlığında ¼¼¼nc¼ ve yeni bir y¼ntem ise, bitki aktivat¼rleri ile ekimden hasata kadar bitki sağlığının aktif hale getirilmesidir.

Bitkiler vir¼s, bakteri, protozoa, nematod, fungus gibi patojenik organizmaların ve ¼eřitli ¼evresel koşulların olumsuz etkilerine maruz kalmaktadırlar. Bakteriler, funguslar, vir¼sler ve nematodlar gibi bir¼ok organizma i¼in besin kaynağı olan bitkiler, patojenlerden soyutlanamazlar. Konak bitki ve patojen arasındaki karşılıklı sinyalizasyon ve tanışmada g¼revli molek¼llerin tanımlanması ve karakterizasyonu, son yıllardaki araştırmaların odağı olmuştur (Aki, 2012).

Bitkiler, ka¼ınılmaz olan patojen saldırılarını algılamak ve karşı koymak i¼in uygun savunma stratejileri geliştirmişlerdir. Bitkiler patojen istilasını etkili bir bi¼imde durdurabilmek i¼in yapılarında varolan fiziksel ve kimyasal engeller kadar, patojen atağı ile aktive olan, uyarılabilir savunma tepkilerini de kullanırlar. Bu savunma mekanizmaları bazı patojenler i¼in caydırıcı bir rol oynamasına karşın bazı patojenler i¼in etkisiz kalmaktadır. Bunun sonucunda da hastalıklar ortaya ¼ıkmaktadır (Aki, 2012).

Bitkiler farklı stres fakt¼rlerine karşı aynı veya benzer savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkiler stresi ya tolere etmekte ya da ondan ka¼ınmaktadırlar. Stres fakt¼rleri yapısal ve metabolik hasarlara neden olmaktadır. Bu hasarlar tersinir ya da geri d¼n¼ř¼ms¼z olabilirler. Bu y¼zden bitkiler sekonder metabolitlerin yanısıra başka savunma yolları geliştirmişlerdir. Bu kimyasal maddelerin ¼nceden hi¼ bir işe yaramadığı bitkiler tarafından ¼retilen artık maddeler olduğu varsayılırdı. Ancak daha sonraları bu maddelerin bitkide; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirmek i¼in bitkiler tarafından geliştirilmiş olduk¼a karmaşık mekanizmaların ¼r¼nleri olduğu anlaşılmıştır.

Doğada oluşan bu sistemi iyileştirmek ve pratiğe aktarmak i¼in geliştirilen bitki aktivat¼rleri, bitkide doğal savunma mekanizması SAR'ı aktive ederek bitkiye korunması i¼in

yardımcı olmaktadır. Bitki korumada devrim niteliğindeki bitki aktivatörleri sadece yeni bir etki mekanizması ile yeni bir kimyasal değil aynı zamanda yeni bir teknolojidir ve tarımsal savaşta halen kullanılan yöntemlere tamamlayıcı olarak rol oynamaktadır.

Bitkiler fungus, bakteri ve virüsler gibi patojenlerin neden olduğu bazı hastalıklardan korunmak için bünyelerinde bir dizi doğal savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Patojenler bitkiye saldırdığı zaman bitki, hücre duvarı ve mum tabakasının varlığı gibi ya önceden oluşmuş engeller yoluyla, ya enfeksiyon bölgesinde hızlı hücre ölümleri ile sınırlanmış savunma bölgesi oluşturarak, ya da “sistemik olarak aktive edilmiş dayanıklılık” diğer bir ifade ile “uyarılmış dayanıklılık” kısaca “SAR” savunma mekanizması ile karşı koymak durumundadır. Kısaca SAR, bitki hastalıklarına karşı bitkide bulunan doğal savunma mekanizmasının uyarılması temeline dayanmaktadır. SAR mekanizması üç gruba ayrılarak incelenebilir. İlk olarak bir teşvik edici uygulanır. Bu bir patojen, sentetik kimyasal ve protein gibi metabolik bir ürün olabilir. İkinci olarak, teşvik edici harekete geçer. Son unsur ise SAR genlerinin aktivasyonundan sonra meydana gelen biyolojik hücre değişiklikleridir. SAR için en iyi bilinen teşvik edici, aspirinin ham maddesi olan, salisilik asittir. Salisilik asit, SAR’da önemli bir rol oynar ve lokal ön enfeksiyon sonrası bitkide artar. Salisilik asit miktarını artıramayan bitkilerde SAR biyolojik olarak uyarılmaz. Bu nedenle salisilik asit SAR’a öncülük eden önemli bir sinyal molekülüdür. Bitkide mevcut olan doğal savunma sisteminin harekete geçirilmesiyle gerçekleşen sistemik kazanılmış dayanıklılığın (SAR) devreye girmesi, bitki koruma için yeni bir teknoloji oluşturmaktadır. Bitki koruma için yeni bir kategori olan SAR reaksiyonu bitki aktivatörleri sayesinde harekete geçirilerek, hastalıklara karşı daha uzun süre dayanıklılık sağlanmaktadır (Aki, 2012). 26 Haziran 2002 tarihli Resmi Gazete’de bitki aktivatörlerinin ruhsatlandırılmasında istenen bilgi ve belgeler açıklanmıştır. Buna göre bitki aktivatörleri “bitkilerin doğal savunma sistemlerini aktive eden, besin maddelerinden daha iyi yararlanmalarını sağlayan, stres koşulları ve benzeri dış etmen ve etkenlerden korunması için yardımcı olan ve verimini ve ürün kalitesini olumlu yönde etkileyen doğal ve/veya kimyasal güçlendirici, direnç arttırıcı, toprak yapısını düzenleyici özellikleri olan ve bu özelliklerden birini veya birkaçını bir arada taşıyan maddelerdir” diye tanımlanmıştır.

Bitki aktivatörlerinin kullanım amaçları, mücadelesi çok güç olan patojenlere karşı bitkilerin savunma sistemini uyarmak (aşılama), fungusit etkililiğini arttırmak, bitkilerde diğer

mekanizmaların uyarılması ile daha kaliteli ve daha fazla ürün elde etmek, ardışıklı kullanım ile daha az pestisit ile daha fazla hastalık kontrolü sağlamaktır.

Biyoaktivatörler, pek çok çevre tarafından biyokimyasal pestisitler olarak adlandırılırsalar da, tahmin edilenin aksine direkt olarak öldürücü etkileri bulunmamaktadır. Bunun yerine, konakçı dokusuna patojenin penetrasyonunu önleyerek veya patojenlere karşı savunma mekanizmasını aktive ederek, konakçı-patojen interaksyonundaki belli basamaklara engel olmaktadır. Bu dolaylı etkilerine bağlı olarak Hastalık Kontrol Ajanları olarak da anılmaktadırlar. Biyoaktivatörler ve biyostimülantlar, hastalık rezistansındaki boşluğu dolduracak bir köprü görevi görmekte, bitkiye kendini koruması için sinyal göndermektedirler. Başka bir deyişle SAR'ın uyarılmasına sebep olmaktadır. Bu maddelerin çok az miktarlarda da olsa bitki bünyesine verilmesi; insan bağışıklık sisteminde aşından sonra oluşan tepkilerin benzerlerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu aktivasyon bitki bağışıklığı olarak adlandırılır ve memelilerdeki bağışıklık sistemiyle kıyaslanabilir. Bu gruptaki maddelerin sağladıkları en önemli avantaj ise daha seyrek uygulama sonucunda daha uzun süreli rezistans sağlamalarıdır (Aki, 2012).

Bitki aktivatörü, bitki savunma mekanizmasını aktif hale getirdiğinde, bitki patojen saldırılarına karşı başarılı bir biçimde korunmaya başlar. Ancak fungus ve bakterilere karşı doğrudan etkisi yoktur. Uygulama zamanı çok önemlidir. Bitki aktivatörleri kullanıldıktan yaklaşık yedi gün sonra, tüm savunma mekanizması tam olarak aktive olmaktadır. Bitki aktivatörlerinin diğer bir avantajı ise, uygulamadan sonra yeni gelişen tüm yeni bitki kısımlarının da hastalıklardan korunmasıdır. Bitki aktivatörleri sadece koruma sağladığı ve var olan infeksiyonları kontrol edemediği için, bu maddelerin mutlaka hastalık oluşmadan önce uygulanması gerekmektedir (Aki, 2012).

1.2. Harpin Proteini

Dünyada ruhsatlı bitki aktivatörü olarak kullanılan çeşitli preparatlar vardır. Bu ürünlerden bazıları; Messenger® (Messenger® bitkinin büyüme, çoğalma ve savunma sistemlerini uyarır. Toksik değildir, çevreye ve insanlara dosttur. Daha sağlıklı, yüksek verimli ürün sağlar.), Maxicrop, ISR 2000, Microfer, Crop-set, Agrifos-400 Humiforte, Stubble-Aid,

Param-A, Apogee'dir. Bitki aktivatörleri, çoğunlukla suda çözünen granül (WG) olarak formüle edilmiştir. Messenger®, bitki koruma ve ürün üretimi için kullanılan, doğal yolla oluşan harpin proteini içeren bir bitki aktivatörüdür.

Bilim adamları, yıllardır bitkilerin patojenleri nasıl tanıdığı ve özellikle bitkilerdeki savunma sistemleri üzerine çalışmalar yapmaktadır. Böyle bir araştırma 1990'larda Cornell Üniversitesi'nde yürütülmüştür. Bu çalışmada, bilimadamları "Ateş Yanıklığı" etmeni *Erwinia amylovora* adlı bakteriyi kullanmışlardır. *Erwinia amylovora* harpin proteini adı verilen bir proteini doğal olarak sentezlemektedir.

Harpin doğal olarak ortaya çıkan bakteriyel içerikli bir proteindir. Bitkinin doğal savunma mekanizmasını harekete geçiren harpin, elma ve armutta ateş yanıklığı hastalığına sebep olan bakteriyel patojen *Erwinia amylovora*'dan izole edilmiştir. Biyokimyasal pestisit olarak sınıflandırılmaktadır. Harpin üretimi *E. coli*'yi zayıflatmakta ve bu sebepten *E. coli* insan midesinde gelişmemekte, canlılığını sürdürememektedir. *E. coli*'nin K-12 hücreleri fermantasyon sonunda öldürülmekte ve yok edilmektedir (Wei ve ark., 1992). İnsan sağlığına zararlı bir etkisi belirlenmemiştir.

Harpin tamamen doğal protein yapısında olup, 400 aminoasit uzunluğundadır ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 40-44 kDa'dur. Suda çözünebilir, granül yapıdadır. Düşük toksisite ve kalıntı azlığı nedeniyle tercih edilmektedir (URL5, 2007).

1.3. Harpin' in Etki Mekanizması

Bitkilerde birçok bakteri, fungus, virüs ve nematoda karşı doğal dayanıklılık mekanizmasının temel bileşeni, aşırı duyarlılık tepkisi (hypersensitive response)'dir. Bu tepki; bir patojen tarafından etkilenen dokularda hızlı ve lokal doku ölümü olarak kendini gösterir. Bu kısmi dokuların zarar görmesi sonrasında sistemik etkili dayanım mekanizması devreye girer. Bu mekanizma ile bitkide geniş etkili sistemik bir dayanım ortaya çıkar (Wei ve ark., 1992).

Harpin tercihen yaprak uygulamaları şeklinde ve bitki vejetasyon süresince 14 günlük aralıklarla kullanılmaktadır. Bir bitkiye uygulandığında harpin proteinleri bitki reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma süreci sırasında bitki bünyesindeki yüzlerce genin katılımıyla birçok

biyokimyasal reaksiyon uyarılır. Bitkide meydana gelen bu tepkinin sonucunda dayanım mekanizması aktif hale gelir ve büyüme teşvik edilir. Harpin, bitki bünyesindeki büyüme mekanizmalarını etkileyerek bitkinin doğal fizyolojik yapısına olumlu yönde etki eder. Bu olumlu, etki salisilik asit ve jasmonik asit sentezini ve bitki büyüme mekanizması hızlandırır. Salisilik asit, SAR'da rol oynayan önemli bir işaret molekülüdür. Salisilik asit ile muamele edilen bitkilerde PRP proteinleri hücreler arasında birikerek etkili hastalık kontrolü sağlamaktadır böylece bitkinin doğal savunma mekanizması harekete geçerek hastalık gelişimini azaltmaktadır. Salisilik asit sentezindeki artış, bitkiye bir patojen saldırısı durumunda doğal dayanım mekanizmasını (SAR) uyararak bir biyolojik direnç sağlar. Jasmonik asit sentezindeki artış ise hastalık ve zararlılara dayanımı arttıran bileşimlerin üretimini teşvik eder (Ryals ve ark., 1996).

Bitkiye yapılan uygulamanın tam etkisi 3-5 gün sonra bitki üzerinde görülmektedir. Harpin uygulamasını takiben, aynı zamanda bitki büyüme sistemleri de aktive olur. Kök gelişiminde, yaprak biyomasi, çiçeklenme ve meyve oluşumunda artış görülür. Bitkinin fotosentez aktivitesi ve besin maddesi depolama düzeyi artar. Ürün verimindeki artışın yanı sıra hasat edilen ürünün raf ömrünün uzadığı görülmüştür (URL3, 2001).

1.4. Harpin Proteininin Bitki Büyümesi Üzerine Etkisi

Harpin uygulanan bitkide doğal dayanım mekanizması tetiklenir ve hastalıklara karşı koruyucu bir etki oluşur. Bunun yanı sıra yapılan uygulamaların büyüme ve verim üzerine de etkili olabileceği belirlenmiştir. Bu etki, sadece patojen saldırısı durumunda bitkide meydana gelen olumlu dirençten kaynaklanmamaktadır. Harpin bitkideki temel büyüme mekanizmalarını uyarır. Dolayısıyla bitki boyunda artışa, erken çiçeklenmeye, meyve bağlamaya ve meyvede erken olgunlaşmaya ve verimde artışa da neden olmaktadır (URL4, 2005).

Harpin içerdiği bilinen Messenger® etki mekanizması dört aşamadan meydana gelmektedir (URL2, 2000). Bitkiye uygulandıktan sonra harpin proteini bitki reseptörleri tarafından fark edilir. Bunun sonucunda birçok gen harekete geçer ve farklı biyokimyasal yolları uyarır. Gelişme ve hastalık dayanıklılığında sorumlu olan bu yollar salisilik, jasmonik

asit teşvik edici yolu ve bitki büyüme yollarıdır. Bitki muameleye uğradıktan sonra 5-10 dakika içinde hareket başlamaktadır. Uygulamadan sonra Messenger® güneş, toprak ve bitki mikroorganizmaları tarafından hızla bozulmaktadır. Messenger®, sebzeler, meyveler, ağaçlar gibi geniş ürün gruplarında kullanılmaktadır. Eden Bioscience ve Cornell Üniversitesinde yapılan çalışmalar sonucunda, Messenger®'ın fotosentez ve bitki besin miktarını arttırdığı saptanmıştır. Ulusal Havacılık ve Uzay Yönetimi (NASA) buğday üzerine yaptığı çalışmalar sonucunda buğdayda fotosentez ve besin miktarı artışını doğrulamıştır. Messenger®, zararlılara karşı etki sağlayabilmektedir. Böcek üzerinde direkt olarak öldürücü etki sağlayamamakta fakat bitkinin jasmonik asit yolunu harekete geçirmesi sonucu bitkiyi insektisit ve nematodlar için daha az cazip hale getirmektedir (URL2, 2000).

Kavunda % 10-12 verim artışına (Keinath ve ark., 2007), hıyar ve kiraz domatesinde sırasıyla % 20 ve 25 verim artışına (Tezcan ve ark., 2002), biberde % 5-16 oranlarında verim artışına (Akbudak ve ark., 2007), domateste bitki boyunda artışa (Bishnoi ve Payyavula, 2004), yine domateste meyve bağlama oranlarında % 6,9-7,7, verimde ise % 47-50,3 artışa (Bourbos ve Barbopoulou, 2006) neden olduğu bildirilmektedir.

Yapılan çalışmalar ışığında harpin proteinin etkisi incelendiğinde; doğal dayanım mekanizmasını tetiklediği anlaşılmaktadır ve bitkilerde hastalıklara karşı direnç artırıcı bir etkiye sahip olabileceği düşünülebilir. Pratikte kullanım kolaylığı ve en önemlisi insan sağlığına bilinen olumsuz bir etki yapmaması da tercih edilebilirliğini arttırmaktadır (Akbudak ve ark., 2006).

1.5. Harpin Proteinini İçeren Messenger®'ın Toksikolojik Profili

Messenger® EPA'da toksite kategorisi IV olarak sınıflandırılmıştır (URL1, 2000). Akut toksisite sıçanlarda >5000 mg/kg olarak saptanmıştır. Messenger®'ın kuşlara, balıklara, bal arılarına ve sucul omurgasızlara karşı yapılan testler sonucunda zehirsiz olduğu anlaşılmıştır. Tarla koşullarında ve filizlenme dönemindeki Messenger® uygulanmış bitkilerde fitotoksite gözlenmemiştir.

Yapılan çalışmalar, Messenger®'ın çevre için kalıntı sorununa yol açmadığını göstermiştir. Uygulamadan sonra bitki ve topraktaki mikroorganizmalar ve güneş ışığı

sayesinde hızla azalması ve düşük uygulama oranı sebebiyle kalıntı riski bulunmamaktadır. Yıllardır harpin'in üretimi ve uygulaması ile uğraşan araştırmacılar ve işçilerde, bu proteinden kaynaklanan herhangi bir zehirlenme veya alerjik belirti meydana gelmemiştir. Yetişkinler, çocuklar ve bebeklerde harpin kalıntısından dolayı zarar gözlenmemiştir (URL 2, 2000).

1.6. Çalışmanın Amacı

Enzimler, bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı orijinlerden elde edilmektedir. Fakat potansiyel endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimler geniş çapta kullanılmaktadır (Sagiroglu, 1999). Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi pazar faktörleri tarafından da etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim nispeten kolay elde edilebilir. Fakat bitkisel kaynakların da endüstriyel hammadde olarak kullanılmaları, gıda ihtiyaçlarına bağlıdır. Mikrobiyal enzimler ise büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca, mikroorganizmaların üreme süreleri kolaylıkla enzimlerin pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir (Telefoncu, 1986). Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için önemli olarak görünmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Topal vd., 2000).

Reaksiyonları hızlandıran ve kolaylaştıran biyolojik katalizörler olan enzimler, hücreler tarafından genetik kontrol altında hücre içinde sentezlenen organik moleküllerdir (Zaborsky, 1973).

Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini de doğurmuştur (Cevher, 2010).

Böylelikle endüstriyel boyutta üretimi ve kullanımı giderek önem kazanan enzimler, günümüzde bitkisel ve hayvansal dokulardan ve genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla beraber, daha hızlı çoğalmaları, gelişme koşullarının kontrolünün kolay olması ve üretimlerinin mevsimlere bağlı olmaması gibi nedenlerle mikroorganizmalar ticari enzimlerin üretiminde tercih edilen önemli kaynaklar haline gelmişlerdir (İnce, 2006).

Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 90'ı fermente olan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Godfrey ve West, 1996; Aygan, 2008).

Günümüzde üretici ve tüketicilerin bilinçlenmesi sonucunda patojen kaynaklı hastalıklara karşı uygulanan klasik fungusitlere olan talep her geçen gün azalmaktadır ve biyolojik kontrol ve entegre mücadele programları popüler hale gelmektedir. Hastalık ve zararlılara karşı dayanımı arttırıcı olarak kullanılan bioaktivatörler biyolojik mücadelenin önemli yapı taşlarıdır.

Bu çalışmanın amacı; elma, armut gibi meyvelerde Ateş Yanıklığı hastalığına neden olan *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisinden *hrpN* geninin farklı ekspresyon vektörlerine klonlanması, ekspres edilmesi, ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması ve bu proteinin buğday bitkisine uygulanarak bitkideki verimi, bitki biyokütlesi, ürün miktarı, bitki büyüme ve gelişmesi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Besiyeri ve Kimyasallar

BamHI ER0055, DNA ladder SM 0324 (Thermoscientific), *EcoRI* R010115, Protein ladder, BSA B9000 (NEB), *HindIII* 1060A (Takara), T4 DNA Ligaz M1801, Genomik DNA İzolasyon Kiti A1125, Bis-acrylamide, pGEM-T Easy Klonlama Kiti A1360 (Promega), Taq DNA polimeraz EP0402, Jelden Çıkarma Kiti K0513 (Fermentas), Tripton V441613949, EDTA 84211000, Amonyum Sülfat A0448117, Ksiloz, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, β -merkaptotanol 805740, Lizozim, Gliserol K40789992008, KH_2PO_4 567300, Etanol, İzopropanol, Sodyum Asetat TA867065, Nutrient Agar VL646350, Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 2C2133453, Yeast Ekstrakt VM175053, NaCl K34243404 (Merck), Etil alkol, IPTG A1008, Ampisilin A0839, Kanamisin A1493, X-Gal A10070005 (Appllichem), dNTP seti 10297-018 (Invitrogen), CaCl_2 (Aktar Kimya), DEAE-Sepharose DFF100, Trizma Baz T1503, Glisin G8898, Acrylamide A8887, Agaroz, D (+) Glukoz, Etidyum Bromür, Metanol, Fenol, NaOH 06203 (Sigma), 3'5' Dinitrosalisilik asit (Acros), TEMED (Janssen Chimica), Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), Hoagland Besin Solüsyonu (General Hydroponics Flora Micro, Flora Gro, Flora Bloom), Vermikulit (100 lt, Agrakal Tarım Girdileri Üretim İnş. Tic. Ltd. Şti, Serik/Antalya), Bromo phenol blue (Gerbu 080702), SDS (Fisher Scientific BP166),

2.2. Mikroorganizmalar, Plazmitler ve Bitkiler

Escherichia coli BL21(DE3) (NEB), *Escherichia coli* JM101 (NEB), *Erwinia amylovora* EAKKB29 (Selçuk Üniversitesi Fitopatoloji ABD), pET-20b(+) vektörü (Novagen), pET-28a(+) vektörü (Novagen), *Triticum aestivum* (Altındane Ekmeklik Buğday tohumları Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi).

2.2.1. Mikroorganizmalar

2.2.1.1. *Erwinia amylovora* EAKKB29

Enterobacteriaceae familyasına ait *Erwinia amylovora hrpN* genini bulunduran bakteridir. Gram-negatif özellikli, spor oluşturmeyen, çomak şekilli (basil) bakterilerdir (genelde boyları 1-5 µm civarındadır). Kolay kültürlenme özelliğine sahiptir. Seçmeli (fakültatif) anaerob (oksijen varlığında da, yokluğunda da) büyüeyebilirler. Bitki patojenidir.

2.2.1.2. *Escherichia coli* JM101

E. coli JM101 suşu hibrit vektör oluşturma aşamasında kullanıldı. JM101 F' *traD36 proA⁺B⁺ lacI^qΔ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV thi⁺* genotipik özelliklerine sahiptir. JM101 Δ(lacZ)M15 genini içerir ve böylece rekombinat plazmitlerin mavi veya beyaz koloni ayırımına göre ayrılmalarını mümkün hale getirir.

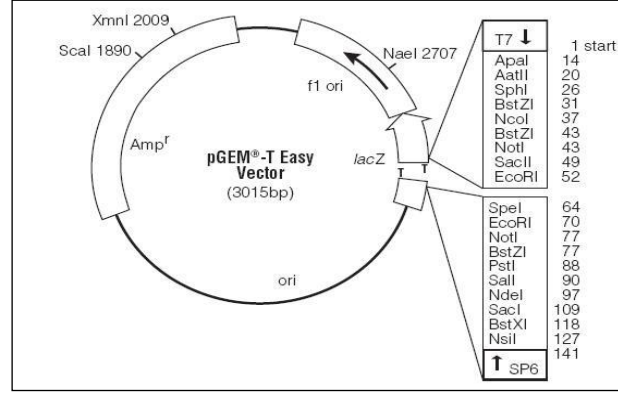
2.2.1.3. *Escherichia coli* BL21(DE3)

E. coli BL21 suşu pET-28a (+) ve pET-20b (+) vektörlerinin ekspresyonu için kullanıldı. *E. coli* BL21(DE3), *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int:::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5* genotipik özelliklere sahiptir.

2.2.2. Plazmitler

2.2.2.1. pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü

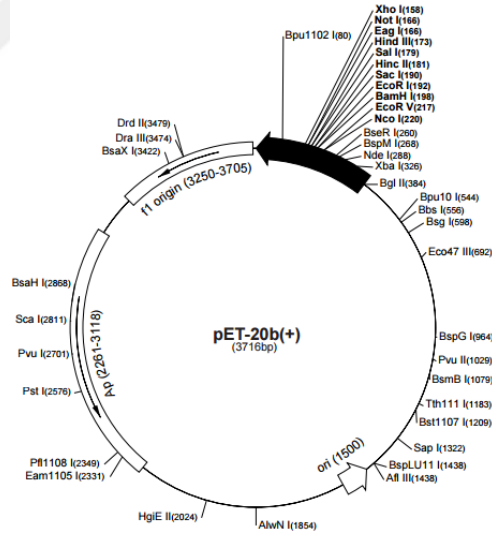
pGEM®-T Easy (Promega) vektörü, PCR ürünlerinin klonlanmasında kullanıldı. pGEM®-T Easy, PCR ürünlerinin klonlanması için uygun bir sistemdir (Şekil 1).



Şekil 1. pGEM-T Easy vektörünün haritası

2.2.2.2. pET-20b(+) Ekspresyon Vektörü

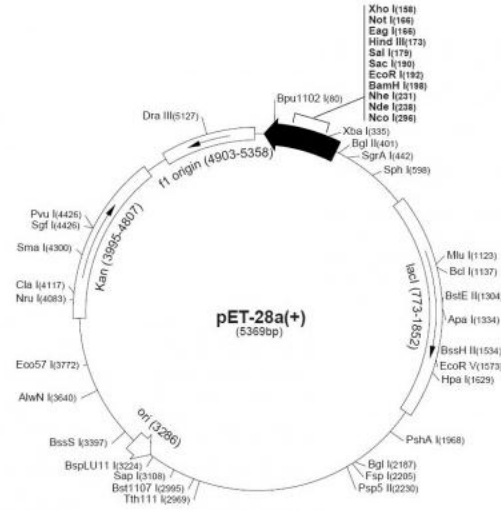
Periplazmada proteinlerin sentezlenmesi için bir sinyal dizisini kodlayan, ampisilin direnç geni bulunduran bakteriyel ekspresyon vektörü.



Şekil 2. Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pET-20b(+) haritası

2.2.2.3. pET-28(a) Ekspresyon Vektörü

Proteinlerin hücre içi (intraselüler) ekspresyonunu sağlayan, kanamisin direnç geni bulunduran bakteriyel ekspresyon vektörü.



Şekil 3. Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pET-28a(+) haritası

2.2.3. Bitki

2.2.3.1. *Triticum aestivum*

Ülkemizde Altındane Ekmeklik Buğday ismiyle bilinen, yazlık karakterli olup, beyaz başaklı, beyaz daneli ve kılçıklı bir buğday çeşididir.

2.3. Moleküler Çalışmalar

2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Erwinia amylovora EAKKB29 bakterisi, LB besiyerinde bir gece 28 °C’de inkübe edildi. Daha sonra Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak genomik DNA’lar izole edildi. Bu amaçla elde edilen sıvı kültürler 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pellet üzerine, 480 µl 50 mM EDTA ilave edilerek vortekslendi. 10 mg/ml’lik konsantrasyondaki lizozimden 120 µl ilave edildikten sonra pipetaj yapılarak pellet çözüldü. Ardından pelletler 37 °C’de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 14.800 rpm’de 2 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant döküldü. Pellet üzerine 600 µl Nuclei Lysis solüsyonu ilave edilerek pipetleme ile çözüldü.

Pelletler 80 °C’de 5 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulurak 3 µl RNaz solüsyonu eklendi. Tüp, 2-5 kez alt üst edildikten sonra 37 °C’de 60 dk inkübe edildi. Ardından 200 µl Protein Precipitation solüsyonu eklenip 20 sn vorteksledikten sonra 5 dk buzda bekletildi. Bu süre sonunda 14.800 rpm’de 3 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp üzerine 600 µl izopropanol eklendi. Pellet oluşuncaya kadar tüpler alt üst edilerek, 14.800 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Pelletin üzerine 600 µl oda sıcaklığında % 70’lik etanol eklenip alt üst edilip, 13.000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi. Süpernatant döküldükten sonra etanolün tamamen uzaklaştırılması için mikrosantrifüj tüpü 15-20 dk 37 °C’de bekletildi. Etanol tamamen uzaklaştırıldığında, pellet üzerine 100 µl DNA Rehidrasyon solüsyonu eklendi ve 65 °C’de 1 saat inkübe edildi. Elde edilen genomik DNA kullanılacağı zamana kadar +4 °C’de saklandı.

2.3.2. Primer Sentezi

Erwinia amylovora EAKKB29 bakterisinde harpin genini amplifiye etmek için HrpNF ve HrpNR primerleri dizayn edildi. Amplifiye edilen genleri pET-20b(+) ve pET-28a(+) vektörlerine klonlama yapılacak şekilde, *Bam*HI, *Hind*III, *Nco*I ve *Hind*III restriksiyon enzimlerinin kesim dizilerini, histidin kod dizilerini ve stop kodonu bulunduran dört farklı primer daha dizayn edildi (Tablo 1).

Tablo 1. *hrpN* genini çoğaltmak ve klonlamak için kullanılan primerler

Primerin Adı	Primerin Baz Dizini
HrpNF	5' -CAT ATG AGT CTG AAT ACA AGT GGG-3'
HrpNR	5' -GGA TCC TTA AGC CGC GCC CAG CTT G-3'
Hrp20-F	5' - CGG ATC CGA TGA GTC TGA ATA CAA GTG-3'
Hrp20-HR	5' - CAA GCT TCG CGT GAT TAG CCG CGC CCA G-3
Hrp20-SR	5' - CAA GCT TCT AGT GAT TAG CCG CGC CCA G-3'
Hrp28-F	5' - CCC ATG GGC AGT CTG AAT ACA AGT GGG-3'
Hrp28-HR	5' - CAA GCT TCG CGT GAT TAG CCG CGC CCA G-3'
Hrp28-SR	5' - CAA GCT TCT AGT GAT TAG CCG CGC CCA G -3'

2.3.3. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi

Erwinia amylovora EAKKB29 bakterisinden *hrpN*'yi kodlayan geninin çoğaltılması amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sında *hrpN* geninin upstream ve downstream bölgelerine uyumlu olarak dizayn edilen HrpNF ve HrpNR primerleri ile PCR gerçekleştirildi. PCR ürünleri, 0,5 mg/ml etidyum bromür içeren % 1,0'lik agaroz jelde yürütüldü ve ürünler BioDocAnalyze Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntülendi. PCR sonucu elde edilen DNA fragmenti, pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Klon olduğu düşünülen plazmitlerin geni içeren bölgeleri sekanslandı ve sekans sonuçları Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve klonlanan DNA fragmentinin 1200 nt'lik *hrpN* genine ait olduğu tespit edildi.

2.3.4. *hrpN* Geninin pET-20b(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspres Edilmesi

PCR ürününün, sekans sonuçlarıyla *hrpN* genine ait olduğu kesinleştirildikten sonra, PCR ile ilgili metod bölümünde anlatılan şartlarda dizayn edilen ekspresyon primerleri ile tekrar PCR yapılarak gen bölgesi çoğaltıldı. PCR ile elde edilen ve uçları uygun enzimlerle kesilen fragmentlerin beklenen aksine pET vektörlerine klonlamasının zor olması ve pET'ye klonlanacak fragmentin doğru dizilimine sahip olduğundan emin olunması için, PCR ürünleri öncelikle pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Doğru fragmenti ve sekansı taşıyan pGEM-T Easy klonları saflaştırıldı. PCR ile üretilen ve klonlanan bu genin uç kısımlarında *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri bulunmaktadır. pET-20b(+) ekspresyon vektörü ve içerisinde *hrpN* geni taşıyan pGEM-T vektörü, *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyonu, 1X enzim tamponu içerisinde, 3 U enzim varlığında 37 °C'de 2 saat süre ile gerçekleştirildi. Bir enzim kesim basamağından sonra etanol presipitasyonu yapılarak ikinci enzim için kesime hazırlandı. Kesim ürünleri % 0,7'lik agaroz jelde yürütüldü. Lineer hale getirilen pET-20b(+) vektörü ve uçları kesilmiş PCR ürün bantları jelden kesilip alındı ve bir Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) aracılığı ile temizlendi. Temizlenen ürünler, ligasyon işlemi ile halkalaştırıldı. Ligasyon; 1,1 µl 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi içerecek şekilde 15 µl son hacimde 16 °C'de 16 saat boyunca gerçekleştirildi.

Ligasyon ürünü CaCl_2 transformasyon metoduyla *E. coli* BL21 suşuna aktarıldı. Transformasyon için, 200 µl alıcı konak hücre içeren tüpe 15 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp, 30 dk buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında daha önceden hazırlanan 42 °C ısıtıcı blokta 2 dk bekletilerek plazmidin hücre içine geçmesi sağlandıktan sonra her bir tüpe 200 µl LB besiyeri eklendi. Tüpler 37 °C’de iki saat bekletildikten sonra daha önce hazırlanmış olan LBA petrilere (50 µg/ml ampisilin içeren) yayılarak 37 °C’de 1 gece, etüvde inkübe edildi. Petri üzerinde oluşan kolonilerden hangisinin klon olduğunu belirlemek için, kolonilerden rastgele seçim yoluyla tarama yapıldı. Seçilen koloniler, 3 ml (50 µg/ml ampisilin içeren) LB besiyeri içinde bir gece boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Üretilen hücrelerden plazmit izolasyon kiti (Invitrogen) ile plazmitler izole edildi. İzole edilen plazmitler, *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz ile kesilerek klonlamanın olup olmadığı agaroz jelde kontrol edildi.

2.3.5. *hrpN* Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspres Edilmesi

PCR ürününün, sekans sonuçlarıyla *hrpN* genine ait olduğu kesinleştirildikten sonra, PCR kısmında anlatılan şartlarda dizayn edilen ekspresyon primerleri ile tekrar PCR yapılarak gen bölgesi çoğaltıldı. PCR ile elde edilen ve uçları uygun enzimlerle kesilen fragmentlerin beklenenin aksine pET vektörlerine klonlamasının zor olması ve pET’ye klonlanacak fragmentin doğru dizilimine sahip olduğundan emin olunması için, PCR ürünleri öncelikle pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Doğru fragmenti ve sekansı taşıyan pGEM-T Easy klonları saflaştırıldı. PCR ile üretilen bu genin uç kısımlarında *Nco*I ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri bulunmaktadır. pET-28a(+) ekspresyon vektörü, içerisinde *hrpN* geni taşıyan pGEM-T vektörü, *Nco*I ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyonu, 1X enzim tamponu içerisinde, 3 U enzim varlığında 37 °C’de 2 saat süre ile gerçekleştirildi. Bir enzim kesim basamağından sonra etanol presipitasyonu yapılarak ikinci enzim için kesime hazırlandı. Kesim ürünleri % 0,7’lik agaroz jelde yürütüldü. Lineer hale getirilen pET-28a(+) vektörü ve uç kısımlarından kesilen PCR ürününün bulunduğu bantlar jelden kesilip alındı ve bir Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) aracılığı ile temizlendi. Temizlenen ürünler ligasyon işlemi ile halkalaştırıldı.

Ligasyon ürünleri, CaCl_2 transformasyon metoduyla *E. coli* BL21 suşuna aktarıldı. Transformasyon için, 200 µl alıcı konak hücre içeren tüpe, 15 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp, 30 dk buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında daha önceden hazırlanan 42 °C ısıtıcı blokta 2 dk bekletilerek plazmidin hücre içine geçmesi sağlandıktan sonra her bir tüpe 200 µl LB besiyeri eklendi. Tüpler 37 °C’de iki saat bekletildikten sonra daha önce hazırlanmış olan LBA petrilere (50 µg/ml kanamisin içeren) yayılarak 37 °C’de 1 gece, etüvde inkübe edildi. Petri üzerinde oluşan kolonilerin hangisinin klon olduğunu belirlemek için, kolonilerden rastgele seçim yoluyla tarama yapıldı. Seçilen koloniler 3 ml (50 µg/ml kanamisin içeren) LB besiyeri içinde bir gece boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Üretilen hücrelerden Plazmit İzolasyon Kiti (Invitrogen) ile plazmitler izole edildi. İzole edilen plazmitler, *Nco*I ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz ile kesilerek klonlamanın olup olmadığı agaroz jelde kontrol edildi.

2.3.6. Harpin Proteininin Saflaştırılması

2.3.6.1. Ni-Affinite Kromotografi Yöntemi ile Saflaştırma

Harpin proteininin saflaştırılması, N-terminaline ilave edilen His-Tag kuyruğundan yararlanılarak nikel içeren bir saflaştırma kiti olan HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) ile gerçekleştirildi. Saflaştırma için 1) Ni bağlama tamponu (Ni-Binding Buffer-20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM β-merkaptotanol), 2) Ni yıkama tamponu (Ni-Washing Buffer-20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM β-merkaptotanaol, 20 mM imidazol) ve 3) Ni-elüsyon tamponu (Ni Elution Buffer-20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM β-merkaptotanaol, 500 mM imidazol) çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan Ni bağlama tamponu çözeltisinden 5 ml kolondan geçirildi ve kolona Ni-bağlanması sağlandı. Ardından Ni yıkama tamponu ve ısı şoku ile kısmi olarak saflaştırılan enzim solüsyonu (10 ml buffer ve 5 ml enzim) 2 kez kolondan geçirildi. Bu basamakta His-Tag kuyruğuna sahip olan harpin proteini nikel afinitesi ile kolona bağlanırken diğer proteinlerin kolondan ayrılması sağlandı. Son olarak enzim içermeyen yıkama tamponu (15 ml) kolondan geçirildi ve diğer proteinlerden temizlendi. Ardından Ni-elüsyon tamponu çözeltisinden her seferde 2 ml kolondan geçirildi ve ayrı ayrı tüplere alındı. Ni-elüsyon tamponunda bulunan imidazol ile His-Tag kuyruğuna sahip olan protein nikelden ayrıldı ve kolondan alındı.

2.3.6.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi

İyon Değişimi Kromatografisi için 50 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada, kolon malzemesi olarak anyonik iyon değiştirici olan DEAE-Sepharose kullanıldı. Hareketli faz olarak 20 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompası ile alındı ve sonrasında bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 500 ml 20 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu ile dengeye getirildi. Özüt kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu malzemesine bağlanmaları sağlandı. Sonrasında kolondan 50 ml daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırıldı. Daha sonra 0,5 M 200 ml'lik NaCl gradient köprüsü kullanılarak kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,5 molara kadar çıkarıldı. Tamponun akış hızı peristaltik pompa ile 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan elüsyonlar 3,5 ml'lik fraksiyonlar halinde cam tüplerde toplandı. Fraksiyonların protein içerikleri hakkında bilgi edinmek için her fraksiyonun absorbansı 280 nm'de spektroskopik olarak ölçüldü. Absorbansiyonu en yüksek yani en fazla protein bulunduran tüpler seçilerek birleştirildi ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi. Elde edilen proteini tuzdan arındırmak için diyaliz yapıldı. Bunun için enzim diyaliz membranı içinde 20 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu içerisine alındı ve 1 gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karışması sağlanarak tuzdan arınması sağlandı. Diyalizden sonra 14.800 rpm de 15 dk santrifüj edilerek bozulan (denatüre olan) proteinlerin atılması sağlandı. Saflaştırılan harpin proteinlerinin saflığı, SDS PAGE'de yürütülerek kontrol edildi. ExPASy programı kullanılarak bu proteinin yaklaşık 40 kDa olduğu hesaplandı. Ayrıca SDS PAGE'de kullanılan markır proteinlerin yardımı ile harpin proteininin moleküler ağırlığının yaklaşık 40 kDa olduğu teyit edildi.

2.4. Bitki Uygulamaları

2.4.1. Bitkilerin Temini ve Büyütülmesi

Buğday (*Triticum aestivum*) tohumları Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Harpin proteinin bitki büyümesine (yaprak, kök, kuru ağırlık, yaş ağırlık) etkisini belirlemek için, her bir gruptan 12'ser adet tohum olmak üzere Hoagland Besin

Solüsyonu içeren 17×17×11 cm ebadındaki plastik kaplarda, ışık yoğunluğu (400-430 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sıcaklık (18-20 °C) ve nem (% 50-70) kontrollü büyüme odasında çimlendirildi. Destek ortamı olarak vermikulit kullanıldı. Çimlenmeden yaklaşık 10-15 gün sonra Hoagland Besin Solüsyonu içerisinde bulunan fidelere kökten çeşitli konsantrasyonlarda harpin proteini muamelesi yapılan bitkilerin yaprak uzunlukları 0. gün, 3. gün, 7. gün ve 10. gün'de ölçüldü. Ayrıca kök uzunluğu, kuru ve yaş ağırlık ölçümleri 10. gün'de yapıldı. Harpin proteini içermeyen, sadece Hoagland Besin Solüsyonu içeren gruplar kontrol grubu olarak alındı.

2.4.2. Analiz ve Ölçümler

Fizyolojik ölçümler, bitkilerin doğal ortamlarında doğrudan bitkilerin yaprakları ve kökleri üzerinden yapıldı.

HrpN(*Ea*)E ve HrpN(*Ea*)E-His, saflaştırma yapılmaksızın, 30 kDa cut off membran ile konsantre edildikten sonra μl 'sinde 0,015 μg olacak şekilde uygulandı.

HrpN(*Ea*)I ve HrpN(*Ea*)I-His ise iyon değişim kromatografisi ile kısmen saflaştırma yapılarak ve μl 'sinde 0,015 μg olacak şekilde uygulandı.

Uygulama sonrasında aşağıdaki parametreler kullanılarak değerlendirilmeler yapıldı.

Yaprak Uzunluğu (cm): Fidelerde ilk gerçek yaprakta, yaprak sapının aya ile birleştiği nokta ile ayanın en uç kısmı arasında kalan kısım cetvel yardımı ile ölçüldü.

Kök Uzunluğu (cm): Toprak yüzeyinden kesilen köklerin yıkandıktan sonra köklerinin cetvel yardımıyla ölçülmesi sonucu elde edildi.

Bitkinin Toplam Yaş Ağırlığı (g): Fidelerde kök ve gövdenin yaş ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü.

Bitkinin Toplam Kuru Ağırlığı (g): Yaş ağırlığı saptanan fidelerin kök ve gövdeleri, alüminyum folyo üzerine yerleştirilerek, sıcaklığı 65 °C'ye ayarlı etüvde sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutuldu ve akabinde kuru ağırlıkları ölçüldü.

3. BULGULAR

3.1. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

LB besiyeri içerisinde çoğaltılan *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisine ait *hrpN* geninin tespiti için, GenBank/NCBI 'da bulunan *Erwinia amylovora* ait olduğu belirlenen *hrpN* gen bölgesine göre dizayn edilen HRPNF ve HRPNR primerleri kullanıldı (Tablo 1). *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak yukarıda bahsedilen primerler ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

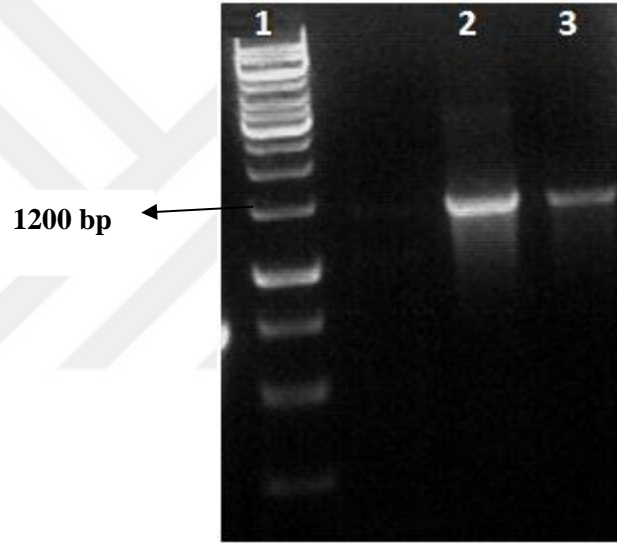
Tablo 2. *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisine ait *hrpN* geninin tespiti için HrpNF ve HrpNR primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR şartları

Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) bileşenleri (50 µL)	Hacim
5X PCR tampon	10 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
dNTP mix (1 mM)	1 µL
HrpN F (10 µM)	1 µL
HrpN R (10 µM)	1 µL
dH ₂ O	32,7 µL
Taq DNA polimeraz	0,3 µL
Kalıp DNA	1 µL

PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 1'lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

Tablo 3. *Erwinia amylovora* EAKKB29 Genomik DNA'sı için PCR protokolü

Sıcaklık °C	Süre(dakika)	Döngü sayısı
94 °C	2	1
94 °C	1	36
52 °C	1	36
72 °C	1,50	36
72 °C	7	1
4 °C	15	1



Şekil4. *E.amylovora* EAKKB29'nın *hrpN* genini içeren PCR ürünleri (1) DNA ladder (1 kb) (2,3) PCR ile *Erwinia amylovora* genomundan elde edilen *hrpN* genine ait fragment

PCR ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlarda klonlandı. Ligasyon reaksiyonu, 16 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün kompetent hücre hazırlandı ve *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

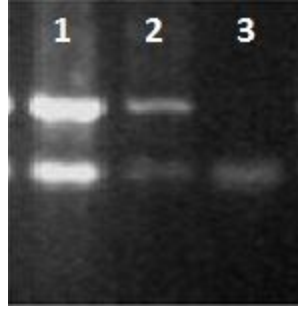
Tablo 4. *E.amylovora* EAKKB29'nın *hrpN* genini içeren PCR ürünlerinin pGEM -T Easy klonlaması için ligasyon bileşenleri

Bileşenler (15 µL)	Hacim
10X T4 DNA ligaz tampon	7,5 µL
Kalıp DNA	5,5 µL
pGEM-T Easy klonlama vektörü (50 ng/µL)	1 µL*
T4 DNA ligaz (1 U)	1 µL

* 1:1 sulandırılmış vektör

Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, plazmit izolasyon kiti (Promega) ile firmanın öngördüğü şartlara göre izole edildi ve agaroz jelde yürütülerek ilgili gen içerebilecek klonlar seçildi, *EcoRI* ile kesildi ve teyit edildi.

Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini, otomatik dizi analizatörleri aracılığı ile (Macrogen, Hollanda) belirlendi. Sekans sonuçları, GenBank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın *Erwinia amylovora hrpN* genine ait olduğu tespit edildi.



Şekil 5. (1,2) *hrpN* genini içeren pGEM-T Easy klonlama vektörünün *EcoRI* ile kesimi (3) Harpin genini içeren PCR fragmenti

3.2. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* Geninin pET-20b(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

hrpN genini içeren PCR fragmentlerinin bir *E. coli* ekspresyon vektörü olan pET-20b(+)'ye klonlanması için, öncelikle *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* geninin içerisinde kesim bölgesi bulunmayan restriksiyon enzimleri belirlendi. pET-20b(+)

ekspresyon vektöründe kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği ve daha önce bu duruma uygun olarak dizayn edilen primerler (Hrp20-F, Hrp20-HR Hrp20-SR) ekspresyon primeri olarak kullanıldı ve PCR işlemi bu primerlerle gerçekleştirildi.

Amplifikasyon sürecinde harpin proteininin His-Tag'lı olabilmesi için ve *hrpN* geninin klonlamasını doğru oryantasyonda ve doğru in-frame'de gerçekleştirmek için *BamHI*, *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzim kesme bölgelerini ve His kodon dizilerini içeren vektöre uygun şu primerler kullanıldı:

Hrp20-F: 5'-CGG ATC CGA TGA GTC TGA ATA CAA GTG -3'
BamHI

Hrp20-HR: 5'- CAA GCT TCG CGT GAT TAG CCG CGC CCA G-3'
HindIII

Amplifikasyon sürecinde *hrpN* geninin klonlamasını doğru oryantasyonda ve doğru in-frame'de gerçekleştirmek için *BamHI*, *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzim kesme bölgelerini içeren vektöre uygun şu primerler kullanıldı:

Hrp20-F: 5'-CGG ATC CGA TGA GTC TGA ATA CAA GTG -3'
BamHI

Hrp20-SR: 5'-CAA GCT TCT AGT GAT TAG CCG CGC CCA G -3'
HindIII

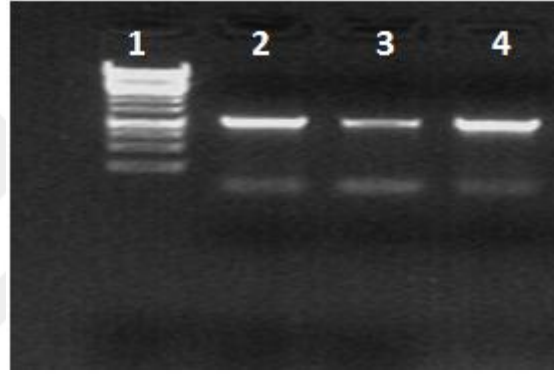
Tablo 5. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* geninin amplifikasyonu ve pET-20b(+)'ye klonlanması için kullanılan PCR şartları

Bileşen (50 µL)	Hacim
5X PCR tampon	10 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
dNTP mix (1 mM)	1 µL
Hrp20-F (10 µM)	1 µL
Hrp20-SR- Hrp20-HR (10 µM) *	1 µL
dH ₂ O	33,2 µL
Taq DNA polimeraz	0,3 µL
Kalıp DNA	1 µL

*Hrp20-SR- Hrp20-HR primerleriyle iki farklı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 6. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* geninin pET-20b(+)'ye klonlanması için kullanılan PCR programı

Sıcaklık °C	Süre (saniye)	Döngü sayısı
94 °C	180	1
94 °C	30	36
58 °C	25	36
72 °C	80	36
72 °C	420	1
8 °C	∞	1



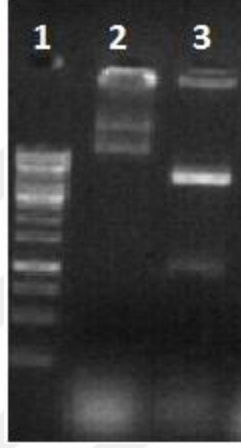
Şekil 6. (1) DNA ladder (1 kb) (2,3,4) *Erwinia amylovora* EAKKB29'nin genomik DNA'sının kalıp olarak kullanılması (Hrp20-SR ve Hrp20-HR primerleri kullanılarak) ile elde edilen PCR ürünlerinin görüntüleri

PCR ile elde edilen DNA fragmentleri, önce *E. coli* JM101 hücresi içinde pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Ardından *hrpN* genini içeren pGEM-T Easy vektörü izole edildi. *hrpN* genini içeren pGEM-T Easy vektörü ve boş pET-20b(+) ekspresyon vektörü *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesim ürünleri % 1,0'lik agaroz jelde yürütülerek, DNA fragmentleri jelden çıkarma kiti ile jelden çıkartıldı.

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen lineer vektör ve DNA fragmentleri, DNA ligaz yardımıyla birbirine yapıştırıldı ve elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM101 suşuna aktarıldı ve bu suş içindeki rekombinant plazmitlerin incelenmesiyle ilgilenilen geni içeren klon bulundu. Klonlar p20*hrpN*(*Ea*) (pET-20b(+)) His-Tag içermeyen klon) ve p20*hrpN*(*Ea*)-His (pET-20b(+)) His-Tag içeren klon) olarak adlandırıldı.

Tablo 7. pET-20b(+) klonlama vektörüne ligasyon için kullanılan şartlar

Bileşenler (15 μ L)	Hacim
10X T4 DNA ligaz tamponu	1,1 μ L
Kalıp DNA	9 μ L
pET-20b (+) klonlama vektörü	9 μ L
T4 DNA ligaz (1 U)	1 μ L



Şekil 7. pET-20b(+) klonu ve kontrol kesim ürünü (1) DNA ladder (1 kb) (2) Harpin genini içeren pET-20b(+) plazmiti (3) Harpin geni taşıyan pET-20b(+) klonunun *Bam*HI ve *Hind*III enzimleriyle yapılan kontrol kesimi

Elde edilen doğru klonu taşıyan plazmit, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edilerek, genin ekspresyonu gerçekleştirildi. Genin ekspresyonu için *E. coli* BL21 hücreleri, 1 mg/mL ampicilin içeren LB besiyerinde 37 °C'de bir gece büyütüldü ve gece kültüründen optik yoğunluğu 0,1 (600 nm) olacak şekilde yeni ampicilinli (1 mg/mL) besiyerine hücreler aşılandı. Kültür, yaklaşık olarak, OD. 0,6'ya ulaştığında 1 mM IPTG ile indüklenerek 20 saat boyunca indüklenmiş kültürün 37 °C'de ve 18 °C'de inkübasyonu gerçekleştirildi. Ekspresyon sonucu elde edilen ürünler, HrpN(*Ea*)E (His-Tag içermeyen) ve HrpN(*Ea*)E- His (His-Tag içeren) olarak adlandırıldı.

3.3. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

hrpN genini içeren PCR fragmentlerinin bir *E. coli* ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)’ye klonlanması için, *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* geninin içerisinde kesim bölgesi olmayan pET-28a(+) vektörünün çoklu klonlama bölgesinde ise var olan restriksiyon enzimleri belirlendi. pET-28a(+) ekspresyon vektöründe kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği ve daha önce bu duruma uygun olarak dizayn edilen primerler (Hrp28-F, Hrp28-SR, Hrp28-HR) ekspresyon primeri olarak kullanıldı ve PCR işlemi gerçekleştirildi.

Amplifikasyon sürecinde harpin proteininin His-Tag’lı olabilmesi için ve *hrpN* geninin klonlamasını doğru oryantasyonda ve doğru in-frame’de gerçekleştirmek için *HindIII*, *NcoI* restriksiyon endonükleaz kesme bölgelerini ve His kodon dizilerini içeren vektöre uygun şu primerler kullanıldı:

Hrp28-F: 5’-CCC ATG GGC AGT CTG AAT ACA AGT GGG-3’
NcoI

Hrp28-HR: 5’-CAA GCT TCG CGT GAT TAG CCG CGC CCA G-3’
HindIII

Amplifikasyon sürecinde *hrpN* geninin klonlamasını doğru oryantasyonda ve doğru in-frame’de gerçekleştirmek için *HindIII*, *NcoI* restriksiyon endonükleaz kesme bölgelerini içeren vektöre uygun şu primerler kullanıldı:

Hrp28-F: 5’-CCC ATG GGC AGT CTG AAT ACA AGT GGG-3’
NcoI

Hrp28-SR: 5’-CAA GCT TCT AGT GAT TAG CCG CGC CCA G -3’
HindIII

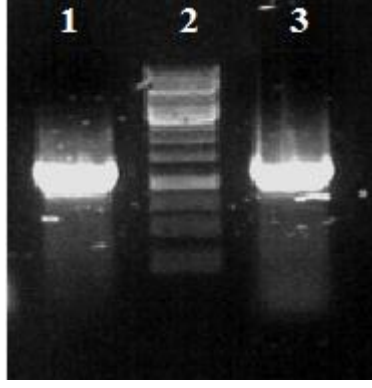
Tablo 8. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* geninin amplifikasyonu ve pET-28a(+)’ya klonlanması için oluşturulan PCR şartları

Bileşenler (50 µL)	Hacim
5X PCR tampon	10 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
dNTP mix (1 mM)	1 µL
Hrp28F (10 µM)	1 µL
Hrp28-SR- Hrp28-HR (10 µM) *	1 µL
dH ₂ O	31,7 µL
Taq DNA polimeraz	0,3 µL
Kalıp DNA	1 µL

*Hrp28-SR- Hrp28-HR primerleriyle iki farklı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 9. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* geninin pET-28a(+) vektörüne klonlanması için kullanılan PCR programı

Sıcaklık °C	Süre (saniye)	Döngü Sayısı
94 °C	180	1
94 °C	3	36
62 °C	30	36
72 °C	45	36
72 °C	420	1
8 °C	∞	1



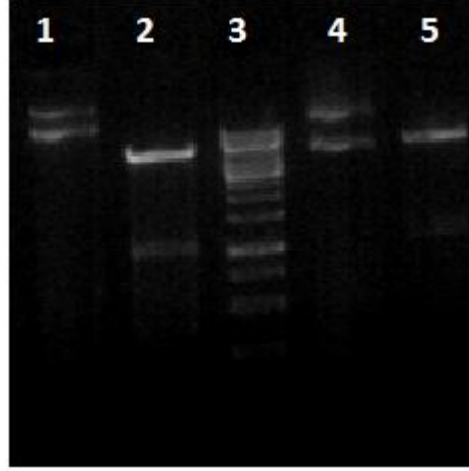
Şekil 8. *hrpN* genini içeren PCR ürünleri (1,3) *Erwinia amylovora* EAKKB29'nın genomik DNA'sı ve Hrp28-SR- Hrp28-HR primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünü (2) DNA ladder (1 kb)

hrpN geninin ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)’ye klonlanmadan önce pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. *hrpN* genini içeren pGEM-T easy vektörü izole edildi. *hrpN* genini içeren pGEM-T easy vektörü ve boş pET-28a(+) ekspresyon vektörü *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon ezimleriyle kesildi. % 1,0’lik agaroz jelde yürütülen DNA fragmentleri jelden çıkarma kiti ile jelden çıkartıldı.

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen lineer vektör ve DNA fragmentleri DNA ligaz yardımıyla birbirine yapıştırıldı ve elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM101 suşuna aktarıldı ve bu suş içindeki rekombinant plazmitlerin incelenmesiyle ilgilenilen geni içeren klon bulundu. Klonlar p28*hrpN*(*Ea*) (pET-28a(+)) His-Tag içermeyen klon) ve p28*hrpN*(*Ea*)- His (pET-28a(+)) His-Tag içeren klon) olarak adlandırıldı.

Tablo10. pET-28a(+) klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar

Bileşenler (15 µL)	Hacim
10X T4 DNA ligaz tampon	1,1 µL
Kalıp DNA	9 µL
pET-28a(+) klonlama vektörü	9 µL
T4 DNA ligaz (1 U)	1 µL



Şekil 9. p28hrpN(*Ea*) ve p28hrpN(*Ea*)-His plazmitleri ve kontrol kesimleri (1) p28hrpN(*Ea*) klonu (2) p28hrpN(*Ea*)'nin *Nco*I ve *Hind*III enzimleriyle yapılan kontrol kesimi (3) DNA ladder (1 kb) (4) p28hrpN(*Ea*)-His klonu (5) p28hrpN(*Ea*)-His'in *Nco*I ve *Hind*III enzimleriyle yapılan kontrol kesimi

Elde edilen doğru plazmit klonu *E. coli* BL21(DE3) hücresine transforme edilerek, genin ekspresyonu gerçekleştirildi. Genin ekspresyonu için *E. coli* BL21(DE3) hücreleri, 1 mg/mL kanamisin içeren LB besiyerinde 37 °C'de bir gece büyütüldü ve gece kültüründen optik yoğunluğu 0,1 (600 nm) olacak şekilde yeni kanamisinli (1 mg/mL) besiyerine hücreler aşılandı. Kültür, yaklaşık olarak, OD. 0,6'ya ulaştığında 1 mM IPTG ile indüklenerek 4 saat boyunca indüklenmiş kültürün 37 °C'de ve 18 °C'de inkübasyonu gerçekleştirildi. Ekspresyon sonucu elde edilen ürünler, HrpN(*Ea*)I (His-Tag içermeyen) ve HrpN(*Ea*)I- His (His-Tag içeren) olarak adlandırıldı.

3.4. Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması

3.4.1. Ni-Affinite Kromotografi Yöntemi ile Saflaştırma

Histidin kuyruk içeren harpin proteininin saflaştırılması, N-terminaline ilave edilen His-Tag kuyruğundan yararlanılarak nikel içeren bir saflaştırma kiti olan HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) sayesinde gerçekleştirildi. Öncelikle nikel kolona bağlı kaldığından diğer proteinler uzaklaştırıldı. Ardından kullanılan imidazol içeren

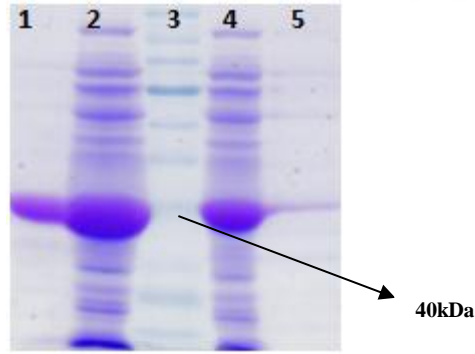
solüsyon yıkama ile histidin kuyuklu harpin proteinlerinin de kolondan ayrılması ve saflaştırılması sağlandı (Şekil 10 ve Şekil 11).

3.4.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi

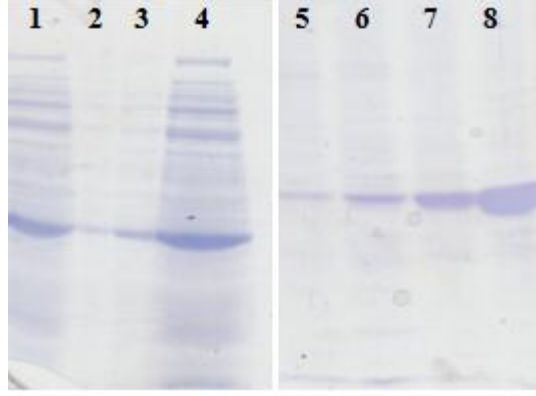
Histidin kuyruk içermeyen harpin proteininin saflaştırılması için, elde edilen hücre özütü iyon değişimi kolon kromatografisinden geçirildikten sonra, elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE’de yürütüldü. Protein özütü içerdiği belirlenen fraksiyonlar diyaliz işlemine tabi tutularak fazla tuzdan arındırıldı (Şekil 10 ve Şekil 11).

3.5. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein jel elektroforezleri, % 15’ lik SDS-PAGE kullanılarak 15 mA’lik akım altında gerçekleştirildi. Harpin enzimlerinin moleküler ağırlığı, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile ilgili proteinlerin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde birlikte yürütülmesi ile belirlendi.



Şekil 10. pET-28a(+) vektörüne klonlanıp, kısmen saflaştırılan rekombinant *Erwinia amylovora* EAKKB29 harpin proteininin SDS-PAGE analizi (1) İyon Değişim Kromatografisi ile kısmen saflaştırılan HrpN(*Ea*)I (2) HrpN(*Ea*)I kaba ekstrakt (3) Markır (4) HrpN(*Ea*)I-His kaba ekstrakt (5) HrpN(*Ea*)I-His Ni-Affinite Kromatografisi ile elde edilen ekstrakt



Şekil 11. pET-20b(+) vektörüne klonlanıp, kısmen saflaştırılan rekombinant *Erwinia amylovora* EAKKB29 harpin proteininin SDS-PAGE analizi (1) Konsantre edilmiş *hrpN(Ea)E*-His (2,5) kısmen saf *HrpN(Ea)E*-His (3,6) kısmen saf *HrpN(Ea)E* (4) konsantre edilmiş *HrpN(Ea)E* (7,8) *HrpN(Ea)E* iyon değişim kromatografisi yöntemiyle elde edilen *HrpN(Ea)E* içeren ekstrakt

3.6. Bitki Uygulamaları

3.6.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Harpin proteinin bitki büyümesine (yaprak, kök, kuru ağırlık, yaş ağırlık) etkisini belirlemek için, her bir grupta 12'şer adet tohum olmak üzere 17×17×11 cm ebadındaki Hoagland besin solüsyonu içeren plastik kaplarda, ışık yoğunluğu ($400-430 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sıcaklık (18-20 °C) ve nem (% 50-70) kontrollü büyüme odasında çimlenme işlemi gerçekleştirildi. Destek ortamı olarak vermikulit kullanıldı. Çimlenmeden yaklaşık 10-15 gün sonra Hoagland Besin Solüsyonu içerisinde bulunan fidelere kökten çeşitli konsantrasyonlarda harpin proteini muamelesi yapılarak bitkilerin 0. gün, 3. gün, 7. gün ve 10. gün ölçümleri alındı. Harpin proteini içermeyen sadece Hoagland besin solüsyonu içeren gruplar kontrol grubu olarak kullanıldı.

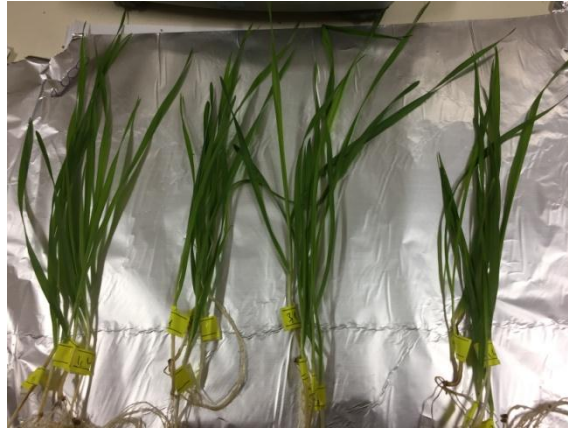


Şekil 12. Buğday (*Triticum aestivum*) fidelerinin uygulamadan önceki hali

3.6.2. Analiz ve Ölçümler

Fizyolojik ölçümler bitkilerin doğal ortamlarında doğrudan bitkilerin yaprakları ve kökleri üzerinden yapıldı.

Uygulama sonrasında aşağıdaki parametreler kullanılarak değerlendirmeler yapıldı.
Yaprak Uzunluğu (cm): Fidelerde ilk gerçek yaprakta, yaprak sapının aya ile birleştiği nokta ile ayanın en uç kısmı arasında kalan kısım cetvel yardımı ile ölçüldü.



Şekil 13. Yaprak uzunluğu ölçümü için hazırlanmış buğday fideleri

Kök Uzunluğu (cm): Toprak yüzeyinden kesilen köklerin yıkandıktan sonra köklerinin cetvel yardımıyla ölçülmesi sonucu elde edildi.



Şekil 14. Kök uzunluğu ölçümü için hazırlanmış buğday fideleri

Bitkinin Toplam Yaş Ağırlığı (g): Fidelerde kök ve gövdenin yaş ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü.



Şekil 15. Bitkinin toplam (kök ve yaprak) yaş ağırlık ölçümü için hazırlanmış buğday fideleri

Bitkinin Toplam Kuru Ağırlığı (g): Yaş ağırlığı saptanan fidelerin kök ve gövdeleri alüminyum folyoya yerleştirilerek, sıcaklığı 65 °C'ye ayarlı etüvde sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletilmesi sonrasında terazide kuru ağırlıkları ölçüldü.

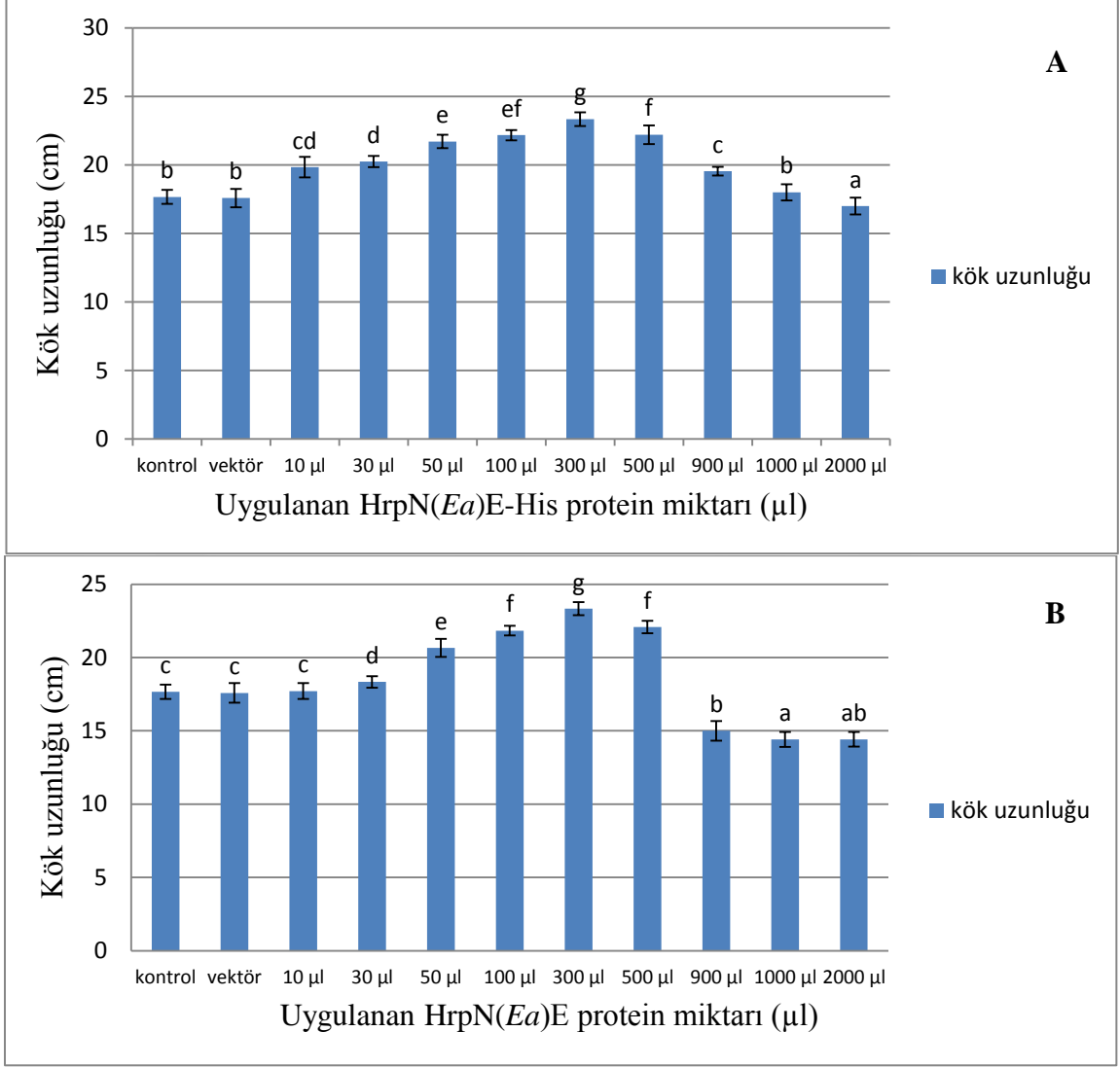


Şekil 16. Bitkinin toplam (kök ve yaprak) kuru ağırlık ölçümü için hazırlanmış buğday fideleri

3.6.2.1. HrpN(Ea)E ve HrpN(Ea)E-His Proteinlerinin Bitkinin Yaş Ağırlığı, Kuru Ağırlığı, Yaprak Uzunluğu ve Kök Uzunluğuna Etkisi

Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen uygulamalar ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 16.0) paket programı içinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile yapıldı. Benzer etkilerin görüldüğü konsantrasyon değerlerinin ortalama ve standart sapmaları alınarak, benzer harflendirmeler yapıldı. En az etki "a" harfiyle başlamak üzere "h" harfine kadar derecelendirme yapıldı.

Çimlenmeden yaklaşık 10-15 gün sonra Hoagland Besin Solüsyonu içerisinde bulunan fidelere, kökten çeşitli konsantrasyonlarda harpin proteini muamelesi yapılarak bitkilerin kök uzunluğu, yaprak uzunluğu, yaş ağırlık ve kuru ağırlık ölçümleri yapıldı.

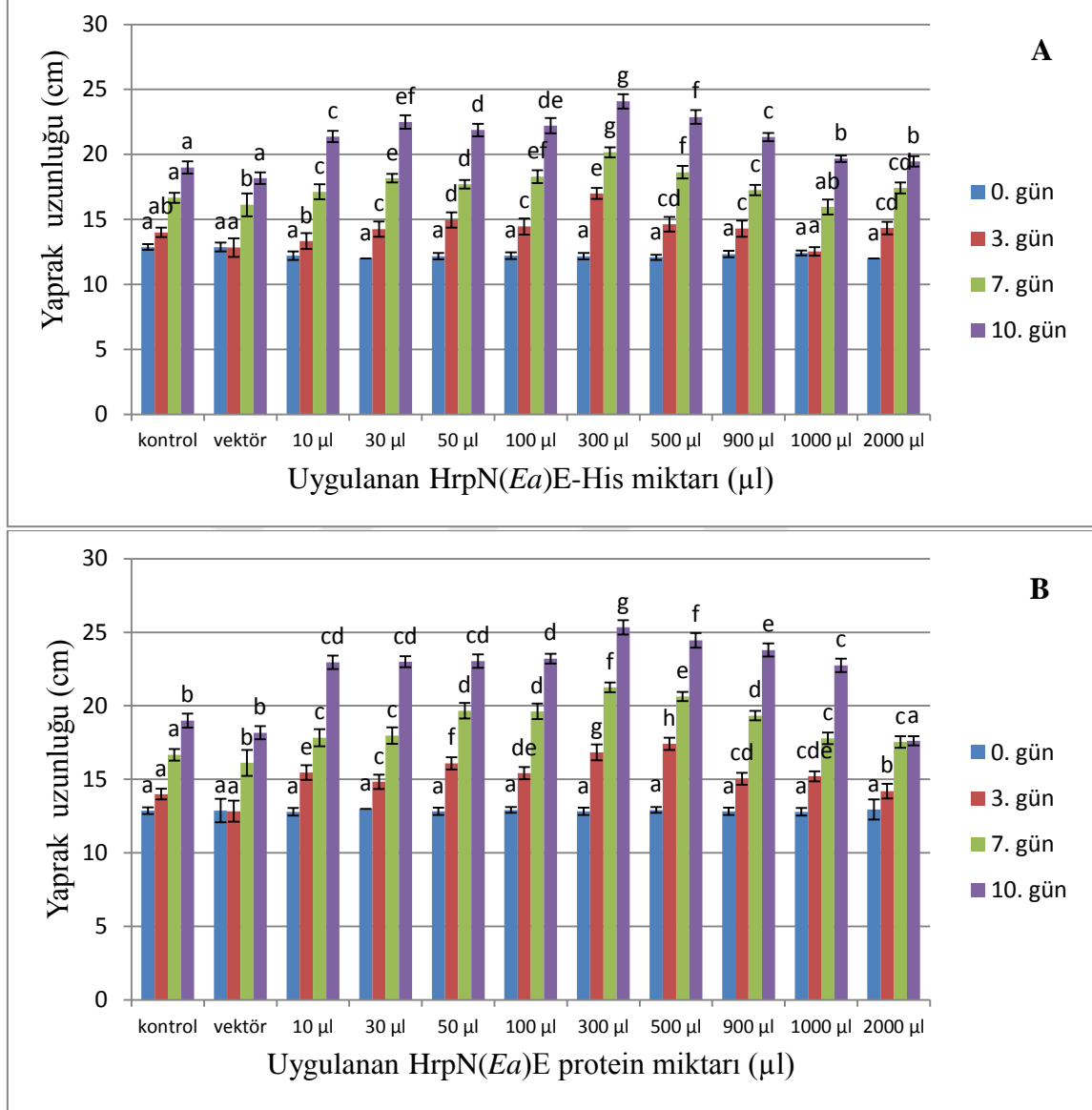


*1 µl = 0,015 µg ekstraselüler ekstrakt

Şekil 17. Harpin proteini içeren konsantre edilmiş ekstraselüler bakteri ekstraktlarının *T. aestivum* fidelerinin kök uzunlukları üzerine etkileri (A) HrpN(Ea)E-His uygulamasının kök uzunluğu üzerine etkisi (B) HrpN(Ea)E uygulamasının kök uzunluğu üzerine etkisi

Kök uygulamaları değerlendirildiğinde, en etkili konsantrasyonun 300 µl (4,5 µg ekstraselüler ekstrakt) olduğu, 900 µl (13,5 µg)' den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı tespit edildi. HrpN(Ea)E-His ve HrpN(Ea)E proteininin saflaştırılması sırasında, kolondan geçirilirken meydana gelen ürün kaybı nedeniyle, harpin proteini uygulaması protein saflaştırması yapılmadan, total protein olarak gerçekleştirildi. Bu sebeple, klon içermeyen vektörü taşıyan BL21(DE3) hücrelerinin bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için hücrenin ekstraselüler ekstraktı uygulaması da gerçekleştirildi. Yapılan analiz

sonucunda uygulanan boş vektörlü ekstraselüler ekstraktın kök uzunluğuna kontrolden farklı bir etkisinin olmadığı belirlendi ve vektörün etkisi olmadığı teyit edildi.

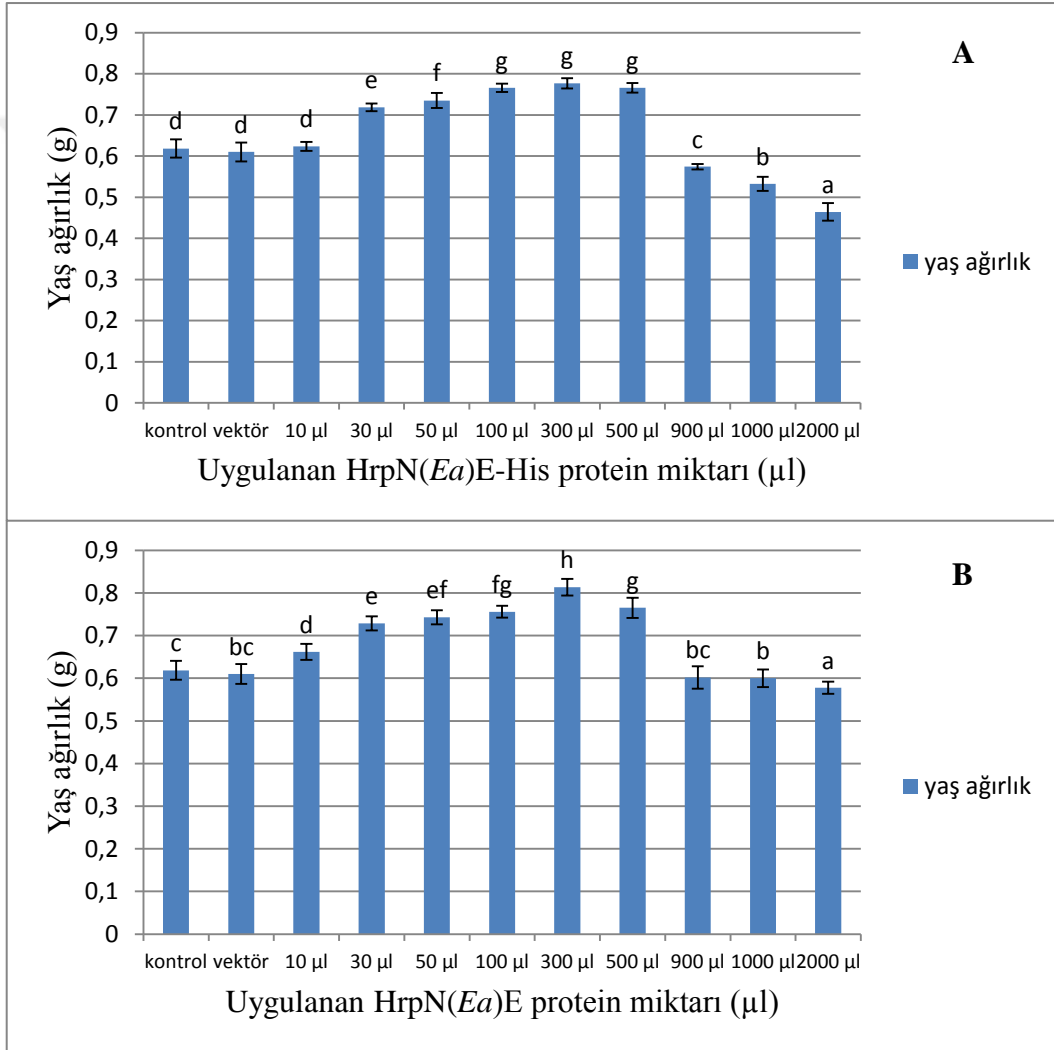


*1 µl = 0,015 µg ekstraselüler ekstrakt

Şekil 18. Harpin proteini içeren konsantre edilmiş ekstraselüler bakteri ekstraktlarının *T. aestivum* fidelerinin yaprak boyları üzerine etkileri (A) HrpN(Ea)E-His uygulamasının yaprak boyu üzerine etkisi (B) HrpN(Ea)E uygulamasının yaprak boyu üzerine etkisi

Enzim 3. günden itibaren etki göstermeye başladı ve 7. gün itibariyle düzenli artış görüldü. Uygulamalar değerlendirildiğinde en etkili konsantrasyonun 300 µl (4,5 µg) olduğu, 900 µl (13,5 µg)'den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı belirlendi.

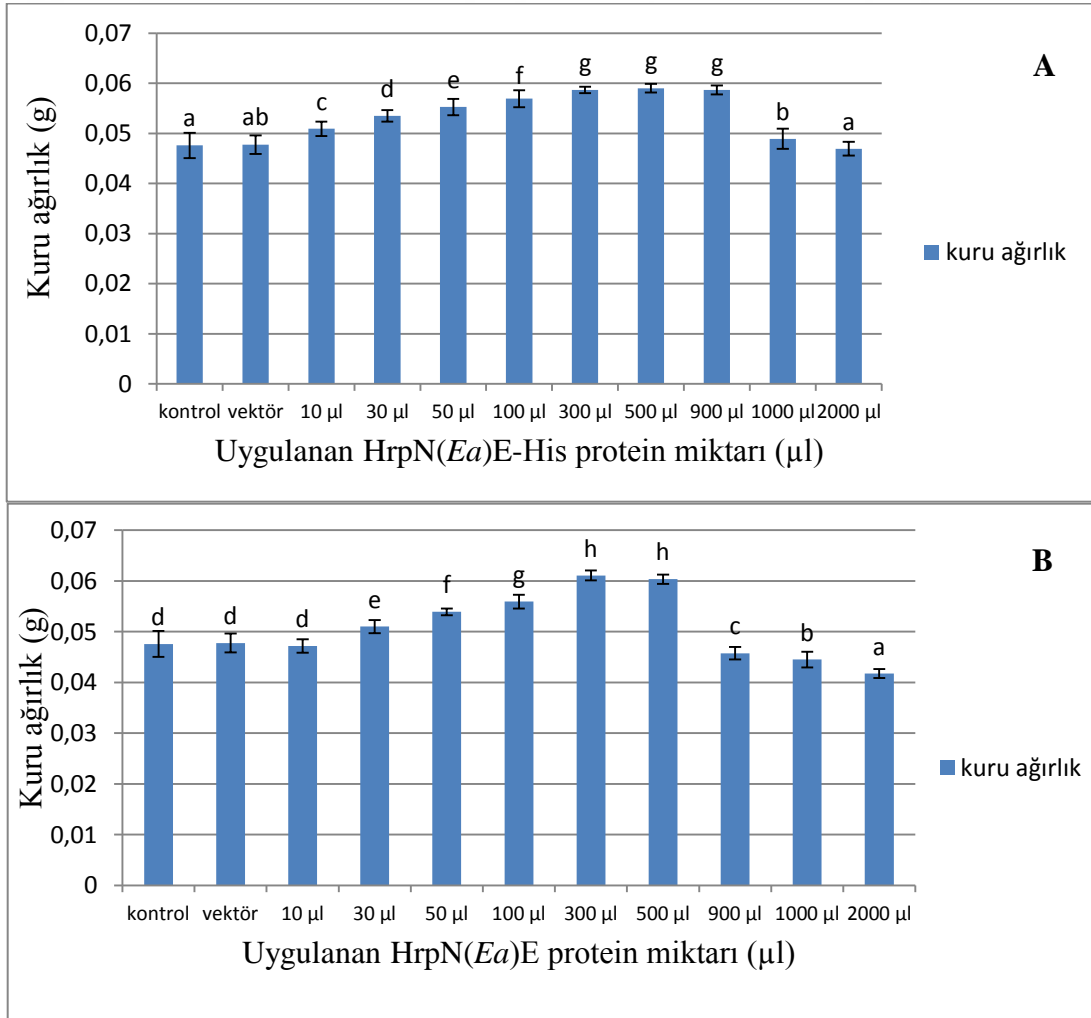
HrpN(*Ea*)E-His ve HrpN(*Ea*)E proteininin saflaştırılması sırasında, kolondan geçirilirken meydana gelen ürün kaybı nedeniyle, harpin proteini uygulaması protein saflaştırması yapılmadan gerçekleştirildi. Bu sebeple, klon içermeyen vektörü taşıyan BL21(DE3) hücresinin bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için, hücrenin ekstraselüler ekstrektı uygulaması yapıldı. Yapılan analiz sonucunda uygulanan boş vektörlü ekstraselüler ekstrektın, yaprak boy uzunluğuna kontrolden farklı bir etkisinin olmadığı belirlendi ve vektörün etkisi olmadığı teyit edildi.



*1 µl = 0,015 µg ekstraselüler ekstrekt

Şekil 19. Harpin proteini içeren konsantre edilmiş ekstraselüler bakteri ekstraktlarının *T. aestivum* fidelerinin yaş ağırlıkları üzerine etkileri (A) HrpN(*Ea*)E-His uygulaması sonucu bitkilerin toplam yaş ağırlık ölçümü (B) HrpN(*Ea*)E uygulaması sonucu bitkilerin toplam yaş ağırlık ölçümü

Yaş ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde en etkili konsantrasyonun 300 μl (4,5 μg) olduğu, 900 μl (13,5 μg)' den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı gözlemlendi. Ayrıca HrpN(*Ea*)E-His protein uygulamasında 100 μl (1,5 μg), 300 μl (4,5 μg) ve 500 μl (7,5 μg) uygulamalarının birbirine yakın olduğu belirlendi. Klon içermeyen vektörü taşıyan BL21(DE3) hücresinin bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için hücrenin ekstraselüler ekstraktı uygulaması yapıldı. Yapılan analiz sonucunda uygulanan boş vektörlü ekstraselüler ekstraktın, toplam yaş ağırlık ölçümünde kontrolün toplam yaş ağırlık ölçümünden farklı bir etkisinin olmadığı belirlendi ve vektörün etkisi olmadığı teyit edildi.



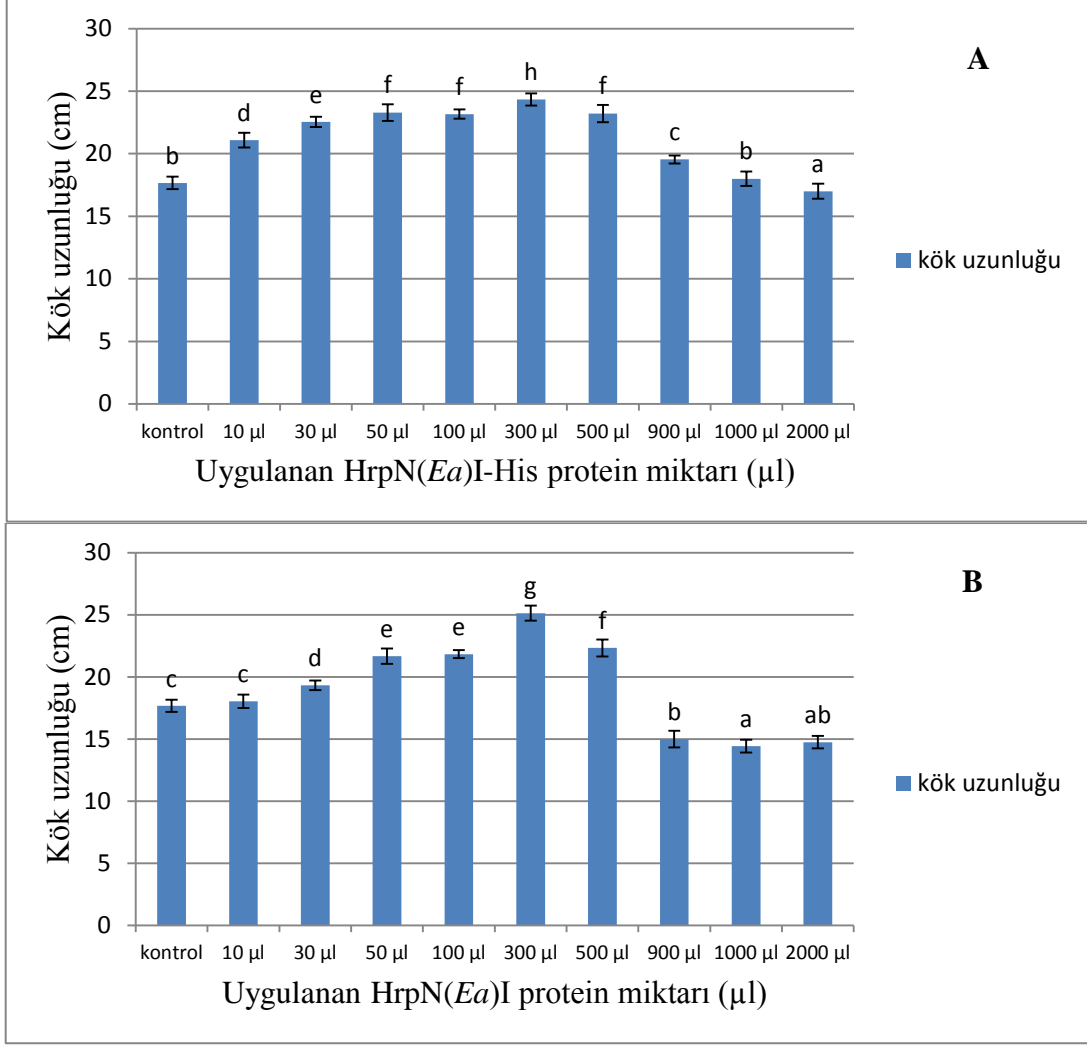
Şekil 20. Harpin proteini içeren konsantre edilmiş ekstraselüler bakteri ekstraktlarının *T. aestivum* fidelerinin kuru ağırlık üzerine etkileri (A) HrpN(*Ea*)E-His uygulaması sonucu bitkinin toplam kuru ağırlık ölçümü (B) HrpN(*Ea*)E uygulaması sonucu bitkinin toplam kuru ağırlık ölçümü

Kuru ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde en etkili konsantrasyonun 300 µl (4,5 µg) olduğu, 900 µl (13,5 µg)' den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı gözlemlendi. Ayrıca HrpN(*Ea*)E-His ve HrpN(*Ea*)E uygulamasında 300 µl (4,5 µg) ve 500 µl (7,5 µg) uygulamalarının etkilerinin birbirine çok yakın olduğu tespit edildi. Klon içermeyen vektörü taşıyan BL21(DE3) hücresinin bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için hücrenin ekstraselüler ekstraktı uygulaması yapıldı. Yapılan analiz sonucunda uygulanan boş vektörlü ekstraselüler ekstraktın toplam kuru ağırlık ölçümünde kontrolün toplam kuru ağırlık ölçümünden farklı bir etkisinin olmadığı belirlendi ve vektörün etkisi olmadığı teyit edildi.

3.6.2.2. HrpN(*Ea*)I ve HrpN(*Ea*)I-His Proteinlerinin Bitkinin Yaş Ağırlığı, Kuru Ağırlığı, Yaprak Uzunluğu ve Kök Uzunluğuna Etkisi

Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen uygulamalar ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 16.0) paket programı içinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile yapıldı. Benzer etkilerin görüldüğü konsantrasyon değerlerinin ortalama ve standart sapmaları alınarak, benzer harflendirmeler yapıldı. En az etki "a" harfiyle başlamak üzere "h" harfine kadar derecelendirme yapıldı.

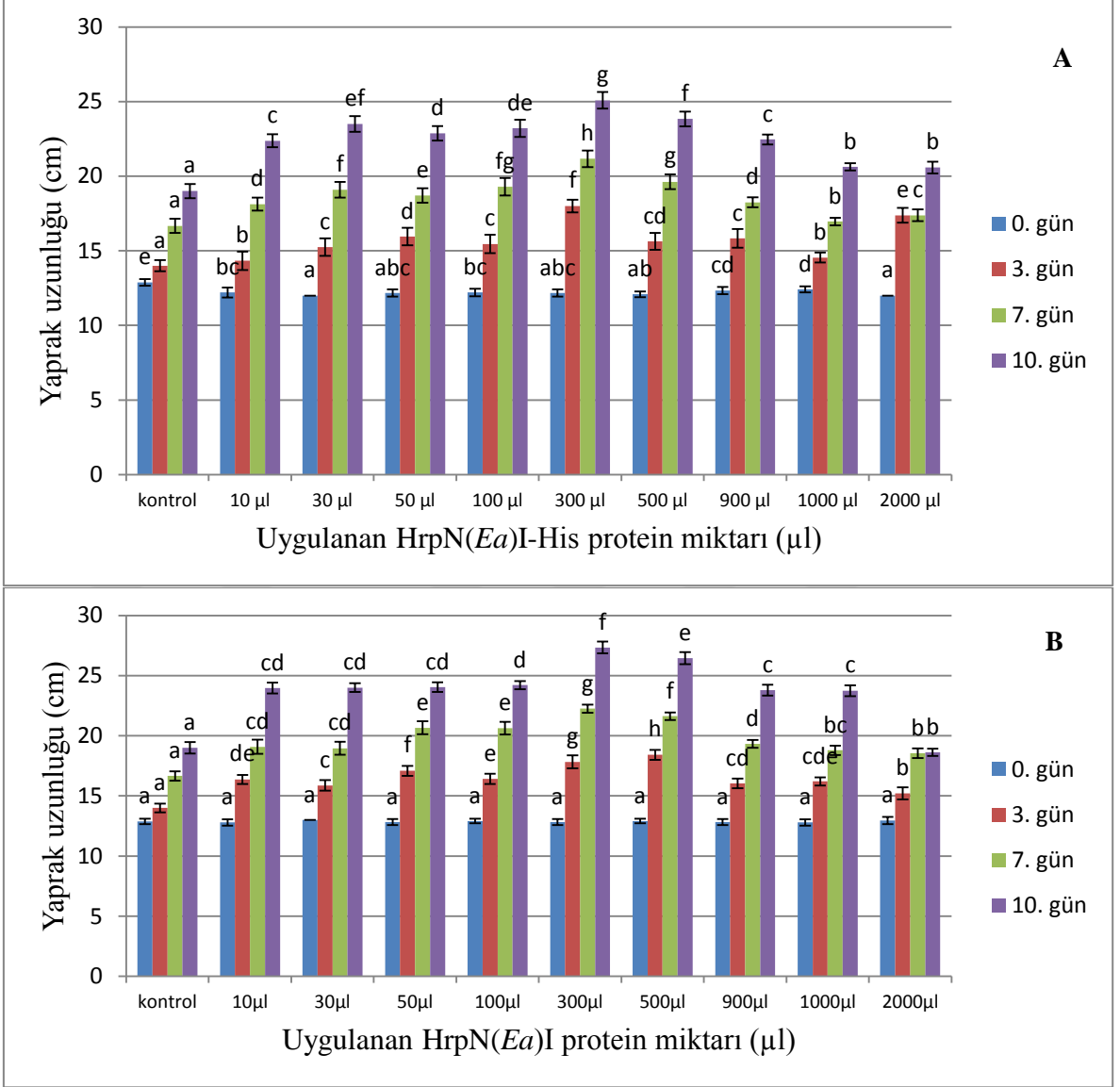
Çimlenmeden yaklaşık 10-15 gün sonra Hoagland Besin Solüsyonu içerisinde bulunan fidelere kökten çeşitli konsantrasyonlarda harpin proteini muamelesi yapılarak bitkilerin kök uzunluğu, yaprak uzunluğu, yaş ağırlık ve kuru ağırlık ölçümleri yapıldı.



*1 µl = 0,015 µg kısmi saf HrpN(Ea)I-His veya HrpN(Ea)I-His

Şekil 21. Kısmen saflaştırılmış intraselüler harpin proteininin *T. aestivum* kök uzunlukları üzerine etkileri (A) HrpN(Ea)I-His uygulamasının kök uzunluğu üzerine etkisi (B) HrpN(Ea)I uygulamasının kök uzunluğu üzerine etkisi

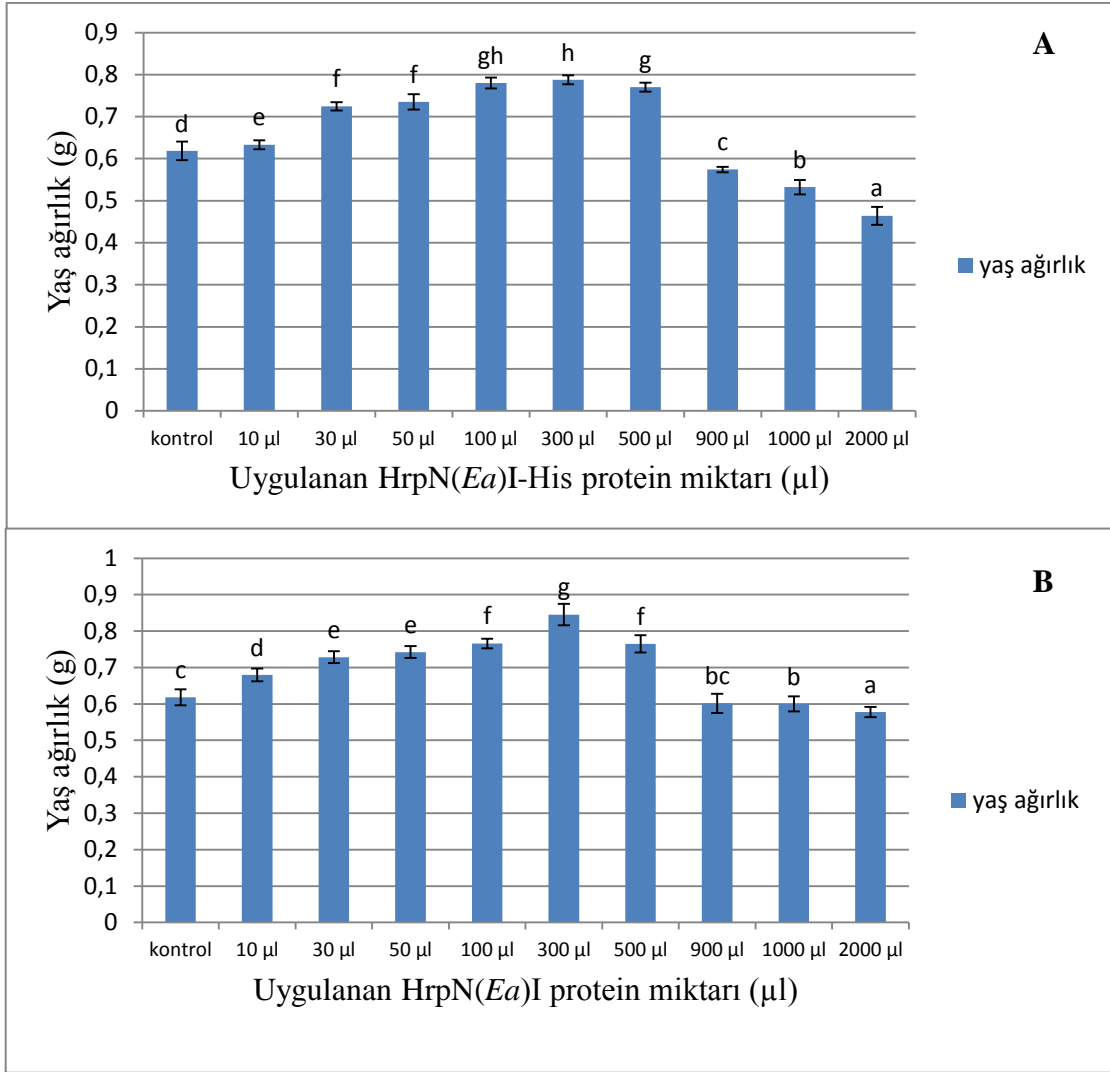
Kök uygulamaları değerlendirildiğinde en etkili konsantrasyonun 300 µl (4,5 µg kısmi saf) olduğu, 900 µl (13,5 µg)' den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı tespit edildi.



*1 µl = 0,015 µg kısmi saf HrpN(Ea)I-His veya HrpN(Ea)I-His

Şekil 22. Kısmen saflaştırılmış intraselüler harpin proteininin *T. aestivum* yaprak boyları üzerine etkileri (A) HrpN(Ea)I-His uygulamasının yaprak boyu üzerine etkisi (B) HrpN(Ea)I uygulamasının yaprak boyu üzerine etkisi

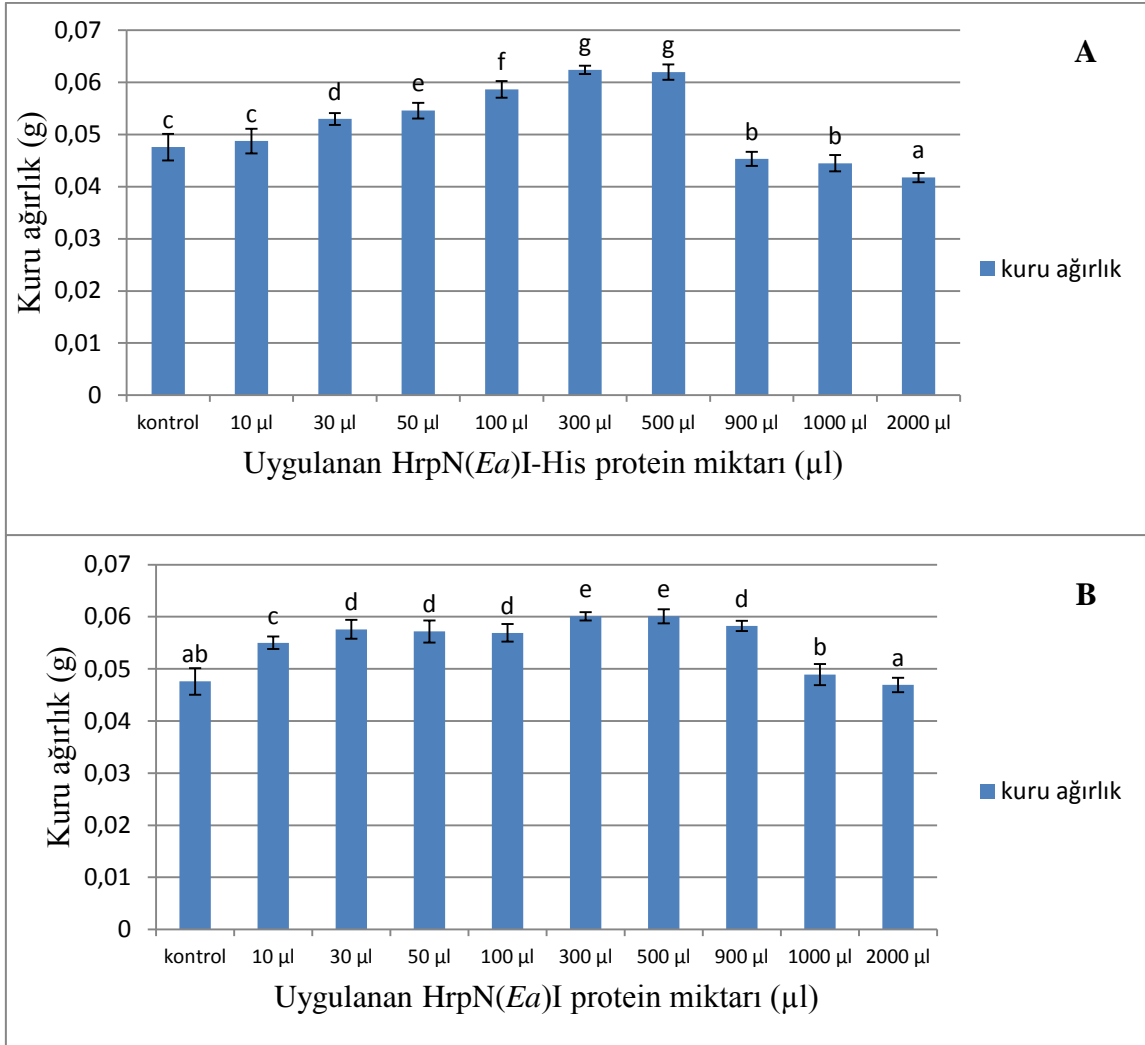
Harpin proteini 3. günden itibaren etki göstermeye başladı ve 7. gün itibariyle düzenli artış görüldü. Uygulamalar değerlendirildiğinde en etkili konsantrasyonun 300 µl (4,5 µg) olduğu, 900 µl (13,5 µg)' den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı belirlendi.



*1 µl = 0,015 µg kısmi saf HrpN(Ea)I-His veya HrpN(Ea)I-His

Şekil 23. Kısmen saflaştırılmış intraselüler harpin proteininin *T. aestivum* yaş ağırlık üzerine etkileri (A) HrpN(Ea)I-His uygulaması sonucu bitkinin toplam yaş ağırlığı üzerine etkisi (B) HrpN(Ea)I uygulaması sonucu bitkinin toplam yaş ağırlığı üzerine etkisi

Yaş ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde en etkili konsantrasyonun 300 µl (4,5 µg) olduğu, 900 µl (13,5 µg)' den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı belirlendi.



*1 µl = 0,015 µg kısmi saf HrpN(Ea)I-His veya HrpN(Ea)I-His

Şekil 24. Kısmen saflaştırılmış intraselüler harpin proteininin *T. aestivum* kuru ağırlık üzerine etkileri (A) HrpN(Ea)I-His uygulaması sonucu bitkinin toplam kuru ağırlık ölçümü (B) HrpN(Ea)I uygulaması sonucu bitkinin toplam kuru ağırlık ölçümü

Kuru ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde en etkili konsantrasyonun 300 µl (4,5 µg) olduğu, 900 µl (13,5 µg)' den sonraki konsantrasyonlarda ise etkinin azaldığı belirlendi. Ayrıca HrpN(Ea)I ve HrpN(Ea)I-His'in 300 µl (4,5 µg) ve 500 µl (7,5 µg) uygulamalarıyla benzerlik tespit edildi.



Şekil 25. En yüksek etkiyi gösteren HrpN(*Ea*)I proteininin farklı miktarlarının (1 μ l=0,015 μ g) bitki yaprak ve kök boyuna etkisi (1) kontrol (2) 10 μ l (3) 30 μ l (4) 50 μ l (5) 100 μ l (6) 300 μ l (7) 500 μ l (8) 900 μ l (9) 1000 μ l

4. TARTIŞMA

Ülkemiz hızla artan kent nüfusuna rağmen, hala ekonomisi tarıma dayalı bir ülke durumundadır. Bununla birlikte, hızla artan nüfus ve kentleşmeyle birlikte her geçen gün tarım alanlarının azalmasına ve kişi başına düşen tarım ürünü miktarının düşmesine neden olmaktadır. Geçmişte tarımsal ürün bakımından kendi kendine yeten ülke konumunda olan Türkiye, şimdi birçok ülkeden tarımsal ürün ithal etmektedir. Bunun en önemli sebeplerinden biri, ekonomik olarak önemli bitkilerde hastalık ve zararlılarla mücadelenin bilinçli ve tam bir şekilde yapılamamasıdır.

Günümüzde üretici ve tüketicilerin bilinçlenmesi sonucunda patojen kaynaklı hastalıklara karşı uygulanan kimyasal içerikli pestisitlere olan talep her geçen gün azalmaktadır ve biyolojik kontrol ve entegre mücadele programları popüler hale gelmektedir. Hastalık ve zararlılara karşı dayanımı arttırıcı olarak kullanılan bioaktivatörler biyolojik mücadelenin önemli yapı taşlarındandır. Ticari olarak kullanılan biyoaktivatörler arasında en çok tercih edilenlerden birisi de Messenger® ticari ismiyle satışa sunulan harpin proteindir. Bitki aktivatörlerinin kullanımı son yıllarda organik tarımda da artış göstermektedir.

Yapılmış olan araştırmalarda genellikle harpin proteininin hastalık üzerine etkisi araştırılmış, fakat sağlıklı bitkiye uygulandığında oluşan etkileri hakkında az sayıda araştırma yapılmıştır. Harpin uygulanan bitkide, bitki biyomasının arttığı, meyve boyutlarının, meyve kalitesinin, ürün veriminin ve stres toleransının arttığı belirlenmiştir.

Bakteriyel ve fungal hastalıkların yaptığı zararları önlemek için bir çok durumda, modern tarımın bir parçası olan pestisitler kullanılsa bile, bitki hastalıklarının oluşturacağı zarar tamamen önlenememektedir. Hem ürün maliyetini arttırması hem de çevreye ve diğer hedef olmayan canlılara verebileceği olası zararlar sebebiyle, bu maddelerin kullanımında her geçen gün daha fazla kısıtlama söz konusu olmaktadır (Kazan ve ark., 2001).

TAGEM tarafından desteklenen “Patates Siğil Hastalığı (*Synchytrium endobioticum*)’na Karşı Bazı Fungisitler ve Rizosfer Bakterileri ile Mücadele Çalışmaları” konulu bir doktora projesinde, harpin proteini içerikli Messenger®’ın diğer bitki aktivatörleriyle birlikte hastalık üzerine etkileri araştırılmış, 10 ml suda 3 g olarak uygulanan Messenger®’ın hastalığı azaltma etkisinin % 26,27 olduğu, buna karşılık 10 ml suda 9 ml olarak uygulanan Cropset®’in hastalığı azaltma etkisinin % 13,97 olduğu belirlenmiştir.

Bu da harpin proteini içeren Messenger®'in diğer bazı bitki aktivatörlerine göre daha etkili olduğunu göstermektedir.

Yine Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Anabilimdalı'nda yapılan "Kabak Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV)'nün Tanısı ve Bitki Aktivatörleri Kullanılarak Mücadele Olanaklarının Araştırılması" adlı bir yüksek lisans tez çalışmasında, aktivatör uygulamasından 24 saat sonra, virüs inokulasyonu yapılan bitkilerin lignin boyama (Phloroglucinol; HCl ile reaksiyona girmekte ve lignin oluşum noktalarını sabitleyerek koyu turuncu veya pembemsi bir renk almasını sağlamaktadır) sonuçlar incelendiğinde, Messenger®'da lignin sentezinin en fazla olduğu ve bunu sırasıyla ACTIGARD® ve ISR-2000®'in izlediği gözlenmiştir. Bitkilerin elisitörler veya avirulent fungal patojenler ile uygulanmaları sonucu reaksiyon noktalarında fenolik ve lignin benzeri materyallerin biriktiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Hornby ve Fitt, 1981; Aist, 1983; Stoltzenburg ve ark., 1984; Nicholson ve Hammerschmidt, 1992). Abiyotik ve biyotik uyarıcılarla dayanıklılığın uyarıldığı bitkilerde, bitki hücre duvarında fenolik bileşiklerden lignin oluşumu, hücre duvarının mekanik gücünü arttırmaktadır. Yapılmış olan bu yüksek lisans tez çalışmasında Messenger®'in bitki savunma sisteminde etkisi görülmektedir.

Bastas ve ark. (2010)'larının yaptığı çalışmada ateş yanıklığı hastalığına karşı, yetiştirme sezonu içerisinde korunmanın devamlılığı ve sürgün gelişimi bakımından, geleneksel ürünlere, streptomisin, bakır ve maneb+bakır, alternatif olarak konukçu dayanıklılığını teşvik edicilerin, harpin protein, benzothiadiazole, prohexadione-Ca etkililiği ve uygulama zamanları, hassas armut çeşitlerinde, sera ve arazi koşullarında değerlendirilmiştir. Harpin proteinin hastalığın önlenmesinde sırasıyla sera ve arazide % 49 ve % 65 oranlarında dikkate değer etki tespit edilmiş olup, ateş yanıklığı hastalığının sürgün yanıklığı evresi kontrolünde, harpin proteininin yanında dayanıklılığı teşvik eden kimyasalların kullanımı önerilmektedir. Söz konusu çalışmada, harpin proteinin sürgüne etkisi belirlenmiş olup harpin proteinine ek olarak dayanıklılığı teşvik edici kimyasalların kullanımının da etkiyi olumlu yönde arttırdığı tespit edilmiştir.

Bunun yanında Tosun ve ark. (2003)'lerinin yaptığı "The Effect of HarpinEa as Plant Activator in Control of Bacterial and Fungal Diseases of Tomato" adlı bir çalışmada, domateste oluşan bakteriyel ve fungal hastalığa karşı harpin proteininin fungusit ve bakteriositlerle kombine uygulamaları yapılmış, harpinin fungusit ve bakteriositlerle kombine uygulamasının olumlu sonuçlar verdiği, bunun yanında tek başına harpinin de

birlikte etkiden ziyade tek etkisinin birçok birlikte kullanımdan daha iyi olduğu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yine bu çalışmada pek çok yüksek bitkide kitinazlar, β -1,3-glukanaz, kitosanaz ve peroksidaz bulunduğu ve bunların çok komponentli savunma sisteminin bir parçası olduğu ve bitkilerin patojenlere karşı savunma tepkimelerinde rol oynadığı belirtilmiştir. (Peroksidaz, bitki (Lagrimini vd., 1997) yeni hücre duvar biyosentezinin indüksiyonunda yaygın olarak kullanılır (Gasper vd., 1982). Peroksidaz ekspresyon seviyelerinin, çeşitli bitki sistemlerinde, stres kimyasalları ve enfeksiyon sonucu değiştiği gösterilmiştir). Hastalıklı bitkiye bitki akvitavörü, fungusit veya bakteriosit uygulandığında hücrede peroksidaz miktarının arttığı belirtilmiştir. Kontrol bitkilerinde peroksidaz aktivitesi 165 mg/mL/dk iken, tek başına harpin (320 mg/mL/dk) uygulandığında bu miktar kontrole göre % 94,0'tür. En yüksek etki, kontrolle kıyaslandığında, % 148 olarak HarpinEa+ Experimental Aventis (410 mg/mL/dk)'te belirlenmiş, en düşük etki ise HarpinEa + Quadris uygulamasında (229 mg/ mL/dk) kontrol grubuna kıyasla % 38,8 daha fazla arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda harpin proteinin bakteriosit ve fungusitlerle birlikte uygulanmasının bitkiye bir zararının olmadığı tespit edilmiş, harpinin de tek başına kullanımının oldukça iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Bu çalışma baz alınarak harpin proteinin doğal yapıda olması nedeniyle çevreye zararı olmadığı düşünüldüğünde, fungusit ve bakteriositin çevreye olan olumsuz etkilerinden dolayı harpin proteinin tek başına kullanımının uygun olduğu önerilebilir.

Çalıştığımız *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisinin *hrpN* geni dışında *hrpW* harpin geninin araştırıldığı belirlenmiştir. Jihyun F. Kim ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada *hrpW*'nin glisin ve serin bakımından zengin olması ve sistein içermemesi nedeniyle bilinen harpinlere benzer bir proteini kodladığı belirtilmiştir. *hrpW* geninin ısı kararlılığının olduğu ve proteaza duyarlı olduğu, prolin ve serin bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. Hiçbir pektat liyaz aktivitesi tespit edilmemesine rağmen, *hrpW*'nin C-terminal bölgesi, benzersiz bir sınıfın pektat liyazlarına homolog olup, *hrpW*'nin bitki hücre duvarına hedef olabileceğini düşündürmektedir. Western blot analiziyle, *hrpW*'nin birkaç *Erwinia* türü arasında korunmuş olduğunu ve *hrpW*'nin bir *hrpN* mutantının HR (hipersensitive response)-indüklenme kabiliyetini artırdığı gösterilmiştir. Bahsi geçen bu çalışma sonucunda *hrpW* geninin *hrpN* genine amino asit içeriği olarak benzer olduğu ayrıca C-terminal bölgesinin pektat liyazlarına homolog olmakla birlikte, pektat liyaz aktivitesi göstermediği, *hrpN* geni gibi direkt bitki savunma mekanizmasını etkilemediği, *hrpN* mutantının HR-indükleyici kabiliyetini artırdığı gösterilmiştir. *hrpW*'nin bitkilerde

HR mekanizmasını aktifleştirdiği belirlenmiş, fakat bunun *hrpW*'nin potansiyel PL (pektat liyaz) aktivitesinden kaynaklanmağı tespit edilmiştir. Son olarak, *hrpW*'nin HR ve patojenite için gerekli olmadığı, ancak aşırı ekspres edildiğinde, bir *hrpN* mutantının HR aktivitesini arttırdığına dair kanıtlar sunulmuştur.

Eden Bioscience'da çalışan bilim adamları harpin genini çeşitli bakterilerden izole edip klonlama çalışmaları yapmış, bu proteini preparat haline getirerek patentlemişlerdir. Firmanın yapmış olduğu çalışmalarda ekspresyon vektörü olarak pET-28a(+) kullanılmıştır. K.T.Ü. Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yapılmış olan bu klonlama çalışmasında, pET-28a(+) vektörü yanında pET-20b(+) vektörü de kullanılmış olup, harpin genlerini taşıyan bu vektörler BL21(DE3) hüccesine transform edilerek, harpin proteinin over ekspresyonu yapılmıştır. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları Bradford (1976) yöntemine göre hesaplanmıştır. SDS-PAGE'e μ l'sinde eşit μ g olacak şekilde yüklenerek ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. pET-20b(+) ekspresyon vektörü kullanılarak elde edilen HrpN(*Ea*)E ve HrpN(*Ea*)E-His ürünlerinin protein bantlarının, pET-28a(+) ekspresyon vektörü kullanılarak elde edilen HrpN(*Ea*)I ve HrpN(*Ea*)I-His ürünlerinin protein bantlarından oldukça zayıf olduğu tespit edilmiştir.

HrpN(*Ea*)E ve HrpN(*Ea*)E-His proteinlerinin saflaştırılması sırasında, kolondan geçirirken meydana gelen ürün kaybı nedeniyle HrpN(*Ea*)E ve HrpN(*Ea*)E-His proteinlerinin uygulaması protein saflaştırması yapılmadan gerçekleştirilmiştir. pET-20b(+) vektörüne (p20*hrpN*(*Ea*) ve p20*hrpN*(*Ea*)-His) klonlanılarak ekspresyonu gerçekleştirilen harpin proteininin, bu vektördeki ekspresyon şartları iyileştirilememiş, pET-28a(+) vektörüne (p28*hrpN*(*Ea*) ve p28*hrpN*(*Ea*)) klonlanılarak ekspresyonu gerçekleştirilen harpin proteininin ekspresyonunda olumlu sonuç alınmıştır. Yine daha önce Eden Bioscience firmasının kullanmış olduğu pET-28a(+) vektörüne klonlama His-Tag'lı olarak yapılmış olup, laboratuvarımızda yapılan pET-28a(+) klonlamasında p28*hrpN*(*Ea*) ve p28*hrpN*(*Ea*)-His klonlamaları elde edilmiş, elde edilen veriler değerlendirildiğinde p28*hrpN*(*Ea*)'nın bitki üzerine etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun da His-Tag'ın protein konformasyonunu olumsuz yönde etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yukarıda da belirtildiği gibi HrpN(*Ea*)E-His ve HrpN(*Ea*)E proteininin saflaştırılması sırasındaki, kolondan geçirilirken meydana gelen ürün kaybı nedeniyle, harpin proteini uygulaması protein saflaştırması yapılmadan gerçekleştirilmiştir. Klon içermeyen vektörü taşıyan BL21(DE3) hüccesinin bir etkisinin olup olmadığını araştırmak

amacıyla hücrenin ekstraselüler ekstraktı uygulaması yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda uygulanan boş vektörlü hücre ekstraktının kontrolden farklı bir etkisinin olmadığı belirlenmiş ve tek başına vektörün etkisi olmadığı teyit edilmiştir. pET-28a(+) vektörüyle rekombinant hale getirilen harpin proteininin ekspresyonu ve saflaştırılması sırasında bir olumsuzluk gözlenmemiştir.

Harpin proteinin bitki büyüme ve gelişmesi üzerine etkisi üzerine yapılan araştırmalar, daha önce de belirtildiği gibi kısıtlıdır. pamuk bitkisi kullanılarak yapılan bir çalışmada, bitkiye 13,2 µg/ml olarak uygulanan Messenger®'ın pamuk bitkisinde çimlenmeden 35 gün sonra bitki boyunu yaklaşık 1 cm artırdığı görülmüş, buna karşılık buğday bitkisi kullanarak yapmış olduğumuz çalışmada 15 µg/ml uygulamalarımızda bitki yaprak boyunda 4 cm'ye kadar artış belirlenmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada harpin proteini, buğday bitkisine besin solusyonuna µl'sinde 0,015 µg olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda verilmiş olup, öncelikle köklerde olumlu bir artış olması beklenmiş, son gün ölçümleriyle de bu teyit edilmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, harpin proteinin bitkinin gelişimi üzerine etkileri *Triticum aestivum* bitkisi üzerinde araştırılmıştır, fakat literatür incelendiğinde yapılan diğer çalışmalarda buğday bitkisi dışında domates, mısır, pamuk, biber, tütün, ahududu, hıyar, armut, elma vb. bitkilerle de harpin proteini denemeleri yapıldığı belirlenmiş olup, harpinin farklı bitki türlerinde de etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bu da gösteriyor ki harpin proteini, farklı bitki türleri üzerine bitki verimliliğini ve ürün kalitesini artırmak için kullanılabilir.

Eden Bioscience'da çalışan bilim adamlarının yaptığı bir çalışmada, üretilen Messenger®'ın sadece hastalık yapan bakteriyal organizmalar üzerine değil viral ve fungal organizmalar üzerine de etkisi saptanmıştır. Bu da preperat (ekstrakt) hale getirmeyi düşündüğümüz harpin proteininin çok amaçlı kullanımının sağlanacağını göstermektedir. Bu ürünün başarılı bir şekilde üretilmesi halinde yurtdışına bağımlılık ortadan kalkacak ve ülkemiz ekonomisine ciddi katkılar sağlayacaktır. Yurtdışından bağımsız olarak birçok bitkide hem ateş yanıklığı üzerine hem de bitki büyüme ve gelişmesine yönelik kullanımı sağlanabilecektir.

Son yıllarda ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmının mikroorganizma kaynaklı enzimler olduğu görülmektedir. Yine son yıllarda yapılan çalışmalar, sistemik dayanıklılık kazanma (SAR) mekanizmasını tetikleyen farklı maddelerin geliştirilmesi yönünde hız kazanmıştır. Geliştirilenler ise, gerek Dünya gerekse Türkiye piyasasında kısa

sürede yer almıştır. Bunların içinde, Harpin Proteini (Messenger®) Dünya’da olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Türkiye’ye, üretilecek olan ürünün muadili olan harpin proteini içeriğine sahip Messenger® markalı ürünün ciddi miktarlarda ithalatı tapılmaktadır. Üretilecek olan ürünün muadili olan harpin proteini içeriğine sahip Messenger® markalı ürün kullanılarak ülkemizde Ziraat Fakültelerinde birçok akademik çalışma yapılmaktadır. Ayrıca özellikle seracılığın yoğun olduğu Akdeniz Bölgesi gibi tarımın yoğun olduğu yerlerde bu ürün yoğun olarak kullanılmaktadır.

Yaptığımız bu çalışma ile harpin geni klonlanmış, ekspresyonu yapılmış ve buğday fideleri üzerinde uygulamaları yapılarak başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. Bu proteinin etkinliğinin artırılması, üretim maliyetinin düşürülmesi, ticari boyutlarda üretimi ve ticarileştirilmesi yönünde çalışmaların yapılması, ülkemiz ekonomisine önemli katkılar sağlayacaktır.

5. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisinin yerel bir izolatından *hrpN* geni PCR yardımıyla elde edildi. PCR aracılığıyla çoğaltılan ve geni içeren fragmentin uzunluğunun 1200 bp olduğu tespit edildi. *hrpN* geni pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanarak sekans ettirildi ve elde edilen fragmentin ilgili gen olduğu tespit edildi. Bu gen pET-20b(+) ve pET-28a(+) vektörlerine histidin kuyruksuz ve kuyruklu olacak şekilde klonlanarak *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ekspres edildi. Farklı sıcaklık (18 °C ve 37 °C), farklı besiyeri (Luria-Bertani broth, Teriffic besiyeri), farklı zaman aralığı (4 saatten 36 saate kadar) denenerek en iyi ekspresyon seviyesi belirlendi. HrpN(*Ea*)E-His ve HrpN(*Ea*)I-His proteinleri, Ni-affinite kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. HrpN(*Ea*)E ve HrpN(*Ea*)I proteinlerinin ise, iyon değişim kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılması yapıldı. Saflaştırılan HrpN(*Ea*)E-His, HrpN(*Ea*)I-His, HrpN(*Ea*)E ve HrpN(*Ea*)I proteinleri SDS-PAGE’de yürütüldü ve moleküler ağırlıkları yaklaşık 40 kDa olarak tespit edildi. Farklı vektörlere klonlama sonucu BL21(DE3) hücrelerine aktarılarak, harpin proteininin over ekspresyonu yapılmıştır. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları Bradford (1976) yöntemine göre hesaplanmıştır. SDS-PAGE’e µl’inde eşit µg olacak şekilde yüklenerek ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır.

HrpN(*Ea*)E-His ve HrpN(*Ea*)E proteininin saflaştırılması sırasındaki, kolondan geçirilirken meydana gelen ürün kaybı nedeniyle harpin proteini uygulaması protein saflaştırması yapılmadan gerçekleştirildi. Bu sebeple klon içermeyen vektörü taşıyan BL21(DE3) hücre ekstraktının bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için hücrenin ekstraselüler ekstraktı uygulaması yapıldı. Yapılan analiz sonucunda uygulanan boş vektörün kontrolden farklı bir etkisinin olmadığı belirlendi ve tek başına vektörün etkisi olmadığı teyit edildi. pET-28a(+) vektörüyle rekombinant hale getirilen harpin proteininin ekspresyonu ve saflaştırılması sırasında bir olumsuzluk gözlenmedi.

Daha sonra ekspresyonu gerçekleştirilen harpin proteinleri *Triticum aestivum* (Altındane Ekmeklik Buğday) bitkisi üzerinde, bitkinin fidesine farklı kombinasyonlarla uygulanarak bitkinin büyüme ve gelişmesi üzerine etkileri araştırıldı. Sonuç olarak; pET-28a(+) vektörüne klonlanarak ekspresyonu gerçekleştiren harpin proteininin, pET-20b(+) klonlanarak ekspresyonu gerçekleştiren harpin proteininden daha etkili olduğu belirlendi.

Yapılan HrpN(*Ea*)E-His, HrpN(*Ea*)I-His, HrpN(*Ea*)E ve HrpN(*Ea*)I protein uygulamalarından, *Triticum aestivum* üzerinde en yüksek etki HrpN(*Ea*)I uygulamasında belirlenmiştir. Yapılan kök boyu, yaprak boyu, kuru ağırlık ve yaş ağırlık ölçümleri sonucunda 300 µl (4,5 µg) uygulamasının en iyi büyüme değerlerini oluşturduğu saptandı.



6. ÖNERİLER

Son yıllarda ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmının mikroorganizma kaynaklı enzimler olduğu görülmektedir. Yine son yıllarda yapılan çalışmalar, sistemik dayanıklılık kazanma (SAR) mekanizmasını tetikleyen farklı maddelerin geliştirilmesi yönünde hız kazanmıştır. Geliştirilenler ise, gerek Dünya gerekse Türkiye piyasasında kısa sürede yer almıştır. Türkiye’de hala piyasada bulunan ve tarım firmaları tarafından pazarlanan ürünlerden bazıları; Actigard (Novartis), Messenger® (Eden Bioscience), Acibenzolar-S-Methyl, Crop-Set (Improcrop) ve ISR 2000 (Improcrop) sayılabilir (Yücer, 2007). Bunların içinde, Harpin Proteini (Messenger®) Dünya’da olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda harpin proteinin etkisi incelendiğinde; doğal dayanım mekanizmasını tetiklediği anlaşılmaktadır ve bitkilerde hastalıklara karşı direnç artırıcı bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Pratikte kullanım kolaylığı ve en önemlisi insan sağlığına bilinen olumsuz bir etki yapmaması da tercih edilebilirliğini arttırmaktadır. Ancak harpinin bitki üzerindeki etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için değişik hastalık etmenlerine karşı ticari koşullarda gerek örtü altında gerekse açıkta farklı tür ve çeşitler kullanılarak yapılacak çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca bu olumlu etkinin hasat sonrasında devam edip etmediğinin belirlenmesi de üretici açısından oldukça önemlidir. Yapılan uygulamaların maliyeti de ürünün kullanılabilirliğini etkileyeceğinden bu konuda da ayrıntılı raporlara ihtiyaç vardır.

Yapılan araştırmalara bakıldığında harpin proteininin, bitkiye uygulandığında, bitki reseptörlerine bağlanarak etki mekanizmasının başladığı görülmüş olup, reseptörlere daha iyi bağlanan harpin mutantları tasarlanabilir.

Yapılan birçok zirai amaçlı çalışmada Messenger®’ın sıklıkla kullanımı görülmektedir. Bu nedenle harpin proteinin üretimi ve preperat haline getirilmesi bu proteinin bu alanda da kullanımını sağlayacaktır. Ayrıca yapılan çalışmalara bakıldığında, harpinle ilgili yapılan çalışmaların çoğunluğunun tarımsal araştırmalar yönünde olduğu, ürünün doğrudan satın alınarak bitki üzerine etkisinin araştırıldığı görülmüş, moleküler alanda ciddi derecede eksiklikler olduğu belirlenmiştir. Bu yönde yapılacak moleküler çalışmaların devamı getirilebilir. Ayrıca literatürde harpinin yapısı ve etki mekanizmasıyla ilgili bilgiler kısıtlı olup, harpinin etki mekanizması aydınlatılarak, diğer biyoaktivatörlerle ilgili çalışmalar arttırılabilir.

Bir çalışma alanı oluşturulup, hasat öncesi ve sonrası çeşitli konsantrasyonlarda uygulamalar yapıp sonuçlar değerlendirilebilir. Hasat öncesi ve sonrası uygulamaları arasındaki etki araştırılabilir. Ayrıca yapılan çalışmalarda harpin proteininin ateş yanıklığı hastalığı ve bitkinin büyüme ve gelişmesi üzerine etkisinin yanında, fotosenteze etkisi de belirlenmiş olup, ilerideki çalışmalarda fotosenteze etki mekanizması da detaylı olarak çalışılabilir.

Bulduğumuz Karadeniz Bölgesi'nde fındık yetiştiriciliği yoğun olarak yapılmaktadır. Üretimi yapılacak olan harpin proteininin bu amaçla da kullanımı sağlanıp, ürün kaybını önlemeye yönelik çalışmalar yapılabilir. Bu da bu bölgedeki üreticilere oldukça fayda sağlayabilir.

Yapılan bu tez çalışmasında elma, armut gibi meyvelerde Ateş Yanıklığı hastalığına neden olan *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisinden *hrpN* geni klonlanmış, harpin proteini ekspres edilmiş ve bitki üzerine etkisi araştırılmıştır. Öncelikle klonlama çalışmaları tamamlanmış olup, ekspresyon seviyelerini iyileştirme üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma ileriye dönük öncü bir çalışma olup, harpin geni bulduran farklı bakterilere ait harpin genleri ekspresyon vektörlerine klonlanıp, ekspresyonları sağlanabilecektir. Ardından bu proteinler farklı konsantrasyon denemeleri yapılarak mısır, domates vb. bitkilerin tohum, yaprak ve meyvelerine uygulanarak bitkilerdeki meyve verimi, bitki biyokütlesi, ürün miktarı, bitki büyüme ve gelişmesi üzerine etkileri araştırılabilecektir. Uygulamanın ardından bitki verimi üzerine etkisi daha iyi olan harpin proteininin ekspres edildiği bakteri seçilip, o bakteriye ait harpin proteini çok miktarda üretilip ekstrakt haline getirilebilecektir. Bunun dışında ateş yanıklığı hastalığı üzerine de etkisi olduğundan bu amaçla da kullanımı sağlanabilir.

Ayrıca, yapılan bu çalışmada yüksek konsantrasyonda uygulanan harpin proteininin bitki üzerine etkisinin, düşük uygulanan konsantrasyona göre az görüldüğü saptanmıştır (900 µl (13,5 µg) ve sonrasındaki etkinin en iyi değer olarak belirlenen 300 µl (4,5 µg)'den daha az olduğu tespit edilmiştir). Bu etkinin nedeninin belirlenmesi için bitkideki etki mekanizması araştırılabilir.

Daha önce yapılan bir çalışmada ekspresyon vektörü olarak pET-28a(+) vektörüne klonlama His-Tag'lı olarak yapılmıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada pET-28a(+) ve pET-20b(+) vektörlerine klonlama yapılmış, klonlara p28hrpN(*Ea*), p28hrpN(*Ea*)-His p20hrpN(*Ea*), p20hrpN(*Ea*)-His adları verilmiş olup, His-Tag'sız protein olan HrpN(*Ea*)I uygulamalarında daha iyi sonuç alınmıştır. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda farklı

ekspresyon vektörleri kullanılarak ekspresyon seviyeleri karşılaştırılabilir ve daha iyi bir sonuç elde edilirse bulunan o vektörün ekspresyon vektörü olarak kullanımı sağlanabilir.

Yapılmış olan bu çalışmanın protein saflaştırma aşamasında ısı şoku uygulaması yapılmamış olup, yapılacak diğer saflaştırmalarda ısı şoku yapılarak proteinin daha saf halde elde edilmesi sağlanabilir.

Litaratüre bakıldığında, *hrpN* genini klonladığımız *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisi dışında harpin geni bulunduran *Erwinia pyrifoliae*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* vb. bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Klonlama çalışmalarında kullandığımız *Erwinia amylovora* EAKKB29 bakterisi dışında, harpin geni bulunduran diğer bakterilerin harpin genleri kullanılabilir.

Yapmış olduğumuz çalışmada harpin proteini besin solusyonuna eklenerek buğday bitkisine verilmiş olup, yapılan farklı çalışmalarda Messenger® adlı harpin içerikli ürünün bitki yapraklarına püskürtme şeklinde uygulandığı tespit edilmiştir. Çalışmamızın devamı niteliğinde olan diğer çalışmalarda bu uygulamalar da denenebilecektir. Yine bu çalışmada sadece bitki gelişimi değerlendirilmiş olup, ileride farklı bitkilere uygulanarak meyve gelişimi ve meyve verimine etkileri araştırılabilir.

Messenger® satın alınarak, üretmiş olduğumuz proteinin etkileri ticari ürünün etkileriyle karşılaştırılabilir.

Diğer bitki aktivatörleri de ayrıntılı araştırılarak elde ettiğimiz proteinin ürüne dönüştürülmesi konusunda bu aktivatörlerin içeriğinden yararlanılabilir.

Kullanmış olduğumuz *Triticum aestivum* bitkisi litaratürde ekmeklik buğday olarak geçmektedir. Yapılan bu çalışmadaki olumlu etkiler göz önüne alındığında *Triticum aestivum* bitkisinin arazi koşullarında yetiştirilip, harpin uygulaması yapılarak, ürün verimliliğine etkisi araştırılabilir. İlerde yapılacak olan bu çalışmada olumlu sonuçlar alınmasıyla, günlük tüketimimizin ana maddesi olan ekmek üretimi için buğday verimliliği ve erken gelişimi konusunda olumlu sonuç alınması oldukça önemli olacaktır.

2007 yılında Messenger® üreticisi olan Eden Bioscience, Plant Healty Care, Inc firması tarafından satın alınmış, Messenger® ile ilgili tüm ürün, bilgi ve haklar, Plant Healty Care, Inc'e devredilmiştir. Messenger® hakkında çalışma yapacak olan araştırmacıların, bu firmanın web sitesini ziyaret etmelerini tavsiye ederiz.

7. KAYNAKLAR

- Akbudak, N., Şeniz, V. ve Tezcan, H., 2007. Effect of Harpin Protein on Yield and Fruit Quality of Pepper Grown in Greenhouse Conditions, *Acta Horticulturae*, 729, 267- 270.
- Akbudak, N. ve Tezcan, H., 2007. Bitkisel Üretimde ve Bitki Korumada Yeni Bir Etken Madde: Harpin, U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 2, 21.
- Aki, C., 2012. Bitki Aktivatörlerinin Kullanım Alanları ve Bitki Verimi Üzerine Etkileri, ÇOMU Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim dalı Çalıştayı.
- Baştaş, K.K., Maden, S., Katırcıoğlu, Y.Z. ve Boyraz, N., 2010. Determination of Application Time for Chemical Control of Fire Blight Disease in Pear Varieties *Journal Of Agricultural Sciences*, 16, 150-161
- Bishnoi, U.R. ve Payyavula, R.S., 2004. Effect of Plant Activators on Disease Resistance and Yield in Tomato and Conalo, Fourth International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, (online) [http://www.cropscience.org.au/icsc2004/](http://www.cropsscience.org.au/icsc2004/)
- Bourbos, V.A. ve Barbopoulou, E.A., 2006. Effect of Harpin Ea on The Fruit Production and Control of *Phytophthora Infestans* in Greenhouse Tomato, *Acta Horticulturae*, 727, 566-570.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72,248-254.
- Cakır, E., 2013. Bazı Bitki Aktivatörlerinin Patates Siğil Hastalığı [*Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Per.]’a Etkileri, *Bitki Koruma Bülteni* 53,4,239-250
- Çalışkan, A.F., 2007. Kabak Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV)’nün Tanısı ve Bitki Aktivatörleri Kullanılarak Mücadele Olanaklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Demirbağ, Z., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Gasper, T., Penel, C. ve Greppin, H., 1982. Peroxidases: A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants, University of Geneva Press, Geneva.
- Hornby, D. ve Fitt, B.D.L., 1981. Effects of Root Invading Fungi on Structure and Function of Cereal Roots. (P.G. Ayres ed.) *Effect of Disease on the Physiology of the Growing Plant*, Cambridge University Pres, Cambridge, 101-130.
- Hunt, M. ve Ryals, J., 1996. Systemic Acquired Resistance Signal Transduction, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15, 583–606.

- Jihyun, F. K. ve Steven, V. B., 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, A New Harpin That Contains a Domain Homologous to Pectate Lyases of a Distinct Class, *J Bacteriol*, 180, 19, 5203–5210.
- Kazan, K., Gürel, E., Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Ün. Basımevi, 456 .
- Keinath, A.P., Holes, G.J., Everts K.L., Egel, D.S. ve Landston D.B., 2007. Evaluation of Combinations of Chlorothalonil with Azoxystrobin, Harpin, and Disease Forecasting for Control of Downy Mildew and Gummy Stem Blight on Melon, *Crop Protection*, 26, 83-86.
- Lagrimini, LM., Gingas, V., Finger, F., Rothstein, S. ve Liu, TTY., 1997. Characterization of Antisense Transformed Plants Deficient in the Tobacco Anionic Peroxidase, *Plant Physiol*, 114, 4, 1187-1196.
- Nicholson, P. ve Hammerschmidt, R., 1992. Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance, *Annu. Rev. Phytopsthol.*, 30, 369-389.
- Onoğur, E. ve Çetinkaya, N., 2002. Ekolojik Tarımda Bitki Korumanın Genel İlkeleri, *Organik Tarım*, Emre Basımevi, İzmir, 184-202.
- Şeniz, V., Eser, B., Daşgan, Y., Akbudak, N., İlbi, H., Sürmeli, N. ve Başay, S., 2005. Sebze Üretiminde Gelişme ve Hedefler, *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi 3-7 Ocak*, Ankara, Kongre Kitabı; 551-563.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu*, Çesme, İzmir-Türkiye, 326.
- Tezcan, H., Akbudak, N. ve Seniz, V., 2002. Harpin Proteinin Yaprak Uygulamalarının Sera Koşullarında Yetiştirilen Hıyar ve Kiraz Domateslerinde Verime Etkisi, *IV. Sebze Tarımı Sempozyumu*, Bursa, Türkiye, Bildiri Kitabı, 27-33.
- Topal, S., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M. ve Çeltik, Ö., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Öne Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I Amilaz, Proteaz, Lipaz, *Turkish Journal of Biology*, 24, 79-93.
- Tosun, N., Karabay, N.U., Turkusay, H., Aki, C., Turkan, I. ve Schading, R.L., 2003. The Effect of HarpinEa as Plant Activator in Control of Bacterial and Fungal Diseases of Tomato, *Acta Horticulturae*, 613, 251– 254.
- URL-1, <http://www.epa.gov> 2000.
- URL-2, <http://www.edenbio.com> 2000.
- URL-3, <http://pubs.rsc.org/-/content/articlepdf/2001/po/b106934a>, 2001.
- URL-4, Messenger Boots Plant Growth and Development. <http://www.edenbio.com> 2005.

URL-5, What is Harpin? <http://www.edenbio.com/usa/technology/download/wp1.pdf> 2007.

Wei, Z., Laby, R., Zumoff, C., Bauer, D., Ho, S.Y., Collmer, A. ve Beer, S.,1992. Harpin, Elicitor of The Hypersensitive Response Produced by The Plant Pathogen *Erwinia amylovora*, *Science*, 257, 85–87.



8. EKLER

Ek 1. *Erwinia amylovora* EAKKB29 *hrpN* Geninin Baz Dizilimi

5'-atgagtctgaatacaagtgggctgggagcgtcaacgATGCAAATTTCTATCGGCGGTGC
GGGCGGAAATAACGGGTTGCTGGGTACCAGTCGCCAGAATGCTGGGTTGGGTGGCAATTCT
GCACTGGGGCTGGGCGGCGGTAATCAGAATGATACCGTCAATCAGCTGGCTGGCTTGCTCA
CCGGCATGATGATGATGATGAGCATGATGGGCGGTGGTGGTTTAATGGGGCTGATGGGCGG
TGGCTTAGGCGGTGGCTTAGGTAATGGCTTAGGTGGCCTGGGCGAAGGACTATCGAACCGG
CTGAACGATATGTTTCGGCGGTTTCGCAGAACACGCTGGGATCGAAAGGCGGCAACAATACCA
CTTCAACAACAAATTCCCCGCTGGACCAGGCGCTGGGTATTAACTCAACGTCCCAAAACGA
CGATTCCACCTCCGGCACAGATTCCACCTCAGACTCCAGCGACCCGATGCAGCAGCTGCTG
AAGATGTTTCAGCGAGATAATGCAAAGCCTGTTTGGTGTATGGGCAAGATGGCACGCAGGGCA
GTTCTCTGGGGGCAAGCAGCCGACCGAAGGCGAGCAAAACGCCTATAAAAAAGGAGTCAC
TGATGCGCTGTCGGGCCTGATGGGTAATGGTCTGAGCCAGCTCCTTGGCAACGGTGGGCTG
GGAGGTGGTCAGGGCGGTAATGCTGGCACGGGTCTTGACGGTTCGTGCTGGGCGGCAAAAG
GGCTGCAAAACCTGAGCGGGCCGGTGGACTACCAGCAGTTAGGTAACGCCGTGGGTACCGG
TATCGGTATGAAAGCGGGCATTTCAGGCGCTGAATGATATCGGCACGCACAGCGACAGTTCA
ACCCGTTCTTTCGTCAATAAAGGCGATCGGGCGATGGCGAAGGAAATCGGTTCAGTTTCATGG
ACCAGTATCCTGAGGTGTTTGGCAAGCCGAGTACCAGAAAGGCCCGGGTTCAGGAGGTGAA
AACCGATGACAAATCATGGGCAAAAGCACTGAGCAAGCCAGATGACGACGGAATGACACCA
GCCAGTATGGAGCAGTTCAACAAAGCCAAGGGCATGATCAAAGCGCCATGGCGGGTGATA
CCGGCAACGGCAACCTGCAGGCACGCGGTGCCGGTGGTTCTTCGCTGGGTATTGATGCCAT
GATGGCCGGTGTATGCCATTAACAATATGGCACTTGGCAAGCTGGGCGCGGCTTAA-3'

Ek 2. Harpin Proteininin Aminoasit Dizilimi

MSLNTSGLGASTMQISIGGAGGNLLGTSRQNAGLGGNSALGLGGNQNNDTVNQLAGLLT
GMMMMSMGGLMGLMGGGLGGGLGNLGLGGLSALNDMFGGSQNTLGSKGGNNTT
STTNSPLDQALGINSTSQNDDSTSGTDSTSDSSDPMQQLLKMFSSEIMQSLFGDGDGTQGS
SSGGKQPTGEQONAYKKGVTDALSGLMGNLSQLLGNLGGGQGGNAGTGLDGSSSLGGKG
LQNLSPVDYQQLGNAVGTGIGMKAGIQALNDIGTHSDSSTRSFVNKGDRAKAKEIGQFMD
QYPEVFGKPQYQKGPQEVKTDKSWAKALSKPDDGMPASMEQFNKAKGMIKSAMAGDT
GNGNLQARGAGGSSLGIDAMMAGDAINNMALGKLGAA

ÖZGEÇMİŞ

Merve BEKTAŞ, 1 Temmuz 1990'da Gümüşhane'nin Torul ilçesinde doğdu. İlkokulu 2. sınıfa kadar Torul Namık Kemal İlköğretim Okulu'nda okudu. Daha sonra Ankara'da Fatih İlköğretim Okulu'nda ilk ve ortaokulu eğitimini tamamladı. Lise eğitimini, Ankara Halide Edip Lisesi'nde tamamladı. 2013 Haziran ayında Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü lisans eğitimini Onur Öğrencisi olarak tamamladı. Bu arada Anadolu Üniversitesi İnsan Kaynakları Yönetimi Bölümü'nde okudu. Daha sonra 2013 Eylül ayında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Aynı zamanda Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü öğrenciliği devam etmektedir.