



Domates (*Solanum lycopersicum* L.)'te Fungisit Stresine Karşı Kitosanın Etkisi

Hüseyin Bulut^{1,*}, Halil İbrahim Öztürk²

^{1,2}Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Erzincan, Türkiye

Makale Tarihiçesi

Gönderim: 17.12.2022

Kabul: 31.01.2023

Yayın: 20.09.2023

Araştırma Makalesi

Öz – Domates içerdiği besin değerleri, kullanım miktarı ve çeşidi bakımından insanlar için önemli bir besin ögesidir. Domates yetiştiriciliğinde verim kayıplarına neden olan önemli faktörlerden birisi mantar hastalıklarıdır. Bu hastalıklarla mücadelede en hızlı ve etkili çözüm olarak fungusitler kullanılmaktadır. Ancak fungusitlerin kullanımı sonucu oluşan stres ve olası toksik riskler besin zincirini etkilemektedir. Çalışmamızda fungusitin olumsuz etkileri ve buna karşı kitosanın bitki yetiştiriciliğinde stresi azaltmak için kullanımını incelendi. % 80 Mancozeb aktif madde içeren fungusitin domateste oluşturduğu stresin düzeyi, kitosanın etkileri SOD, CAT ve MDA ekspresyonlarındaki değişimleri tek hücre jel elektroforezi ve DNA üzerindeki hasarı değerlendirildi. Çalışma sonucunda uygulanan fungusitin domates fidelerinde strese, SOD, CAT ve MDA enzim değerlerinde değişime neden olduğu tespit edildi. Fungisitinin comet assay analizinde DNA ipliklerinde kırılma sonucu oluşan kuyruk uzunluğu ve kuyruk DNA % değerinde artışa neden olduğu belirlendi. Uygulanan kitosanın enzim değerlerinde ve DNA hasarına karşı bazı dozlarda (100 ppm ve 150 ppm) olumlu etkisinin olduğu gözlemlendi. Kitosan bitkilerde stres etkenlerine karşı savunma mekanizmasını desteklemek için kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler – CAT, comet assay, domates, fungusit, kitosan, MDA, SOD

Effect of chitosan against to fungicide stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

^{1,2}Erzincan Binali Yıldırım University, Vocational School of Health Services, Erzincan, Türkiye

Article History

Received: 17.12.2022

Accepted: 31.01.2023

Published: 20.09.2023

Research Article

Abstract – Tomato is an important nutrient for humans in terms of its nutritional values, amount of use and variety. One of the important factors causing yield losses in tomato cultivation is fungal diseases. Fungicides are used as the fastest and most effective solution to combat these diseases. However, the stress and possible toxic risks resulting from the use of fungicides affect the food chain. In our study, the negative effects of fungicide and the use of chitosan to reduce stress in plant breeding were investigated. The level of stress caused by the fungicide containing 80% Mancozeb active substance on tomato, the effects of chitosan, changes in SOD, CAT and MDA expressions, single cell gel electrophoresis and damage on DNA were evaluated. As a result of the study, it was determined that the applied fungicide caused stress and changes in SOD, CAT and MDA enzyme values in tomato seedlings. In the comet assay analysis of the fungicide, it was determined that the tail length and tail DNA % value increased as a result of breakage in the DNA strands. It was observed that the applied chitosan had a positive effect on enzyme values and DNA damage at some doses (100 ppm and 150 ppm). Chitosan can be used to support the defense mechanism against stress factors in plants.

Keywords – CAT, chitosan, comet assay, fungicide, MDA, SOD, tomato

¹ huseyinbulut@erzincan.edu.tr

² hiozturk@erzincan.edu.tr

*Sorumlu Yazar

1. Giriş

Domates meyvesi (*Solanum lycopersicum* L.) dünyada 1.1 milyar ton olan yaş sebze üretiminde 182 milyon ton ile %16'lık paya sahiptir. Ülkemiz 188.270 hektar alanda 13.000.000 ton domates üretimi ile dünyada 4. sırada yer almaktadır (TÜİK, 2022). İçerdiği likopen, fenolik bileşikler, özellikle flavonoidler ve C-E vitaminleri sayesinde önemli bir diyet antioksidan kaynağıdır (Lenucci vd., 2006).

Domates yetiştiriciliğinde üretimi sınırlandırılması ve oluşan verim kayıpları açısından abiyotik ve biyotik stres faktörleri önemli etkenlerdir. Sebze yetiştiriciliğinde meydana gelen hastalıklar verim kaybına neden olan önemli faktörlerden biridir. Yaklaşık 20.000 patojen mantar tespit edilmiş olup, bitki hastalıklarının yaklaşık %85'ine mantarların neden olduğu bilinmektedir (Ong, 2011). Fungisitler, bitkilerde mantar kaynaklı enfeksiyonlarını tedavi etmek, mahsul kaybını önlemek ve tarımsal verimi artırmak için yaygın olarak kullanılan pestisit üyesidir (Kleinkauf vd., 2013; Wise vd., 2019; Yang vd., 2015). Türkiye'de 2021 yılında toplam 52.900 ton pestisit kullanılmış olup bununun 19.100 tonu fungisittir (tarımorman, 2022).

Mancozeb (MCZ), tarımsal üretimde yaygın olarak kullanılan etilen ditiyokarbamat (EBDC) geniş spektrumlu bir fungusit (Belpoggi vd., 2010) olup, ABD'de her yıl elma kabuğu ile patatesten fusarium solgunluğu ve güllerdeki pası tedavi etmek için çok miktarda kullanılmaktadır (Stephenson ve Trombetta, 2020). Dünyanın önemli pestisit tüketicilerinden olan Brezilya'da 2017 yılında elma dikim endüstrisinde 30.000 ton (hektar başına 260 kg'dan fazla) MCZ uygulaması yapılmıştır (Camargo Carniel vd., 2019). Bu kimyasalın büyük ölçekli uygulanması çevre kirliliğine neden olmakta (Costa-Silva vd., 2018) ve ürünlerin yüzeyinde kaldığında besin zincirinde risk teşkil etmektedir (Kaushik vd., 2009; Kontou vd., 2004). Bundan dolayı Dünya Sağlık Örgütü (WHO), MCZ'yi ikincil veya oldukça toksik bir kimyasal olarak sınıflandırmıştır. MCZ'ye maruz kalmanın kanser, endokrin bozukluklar ve üreme bozuklukları gibi çeşitli sağlık sorunları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Jennifer vd., 2017; Sugeng vd., 2013).

Uygulanan kimyasalların bitkiler üzerindeki stres etkisini azaltmak amacıyla son yıllarda organik ürünlerin kullanımı üzerine çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Kitin, selülozla birlikte dünyada en bol bulunan doğal amino polisakarit olup, kitosan kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Kitosan antiviral, antibakteriyel ve antifungal özelliğe sahip olmasının yanında, bitkilerin savunma sistemini teşvik ederek hastalıkların kontrolü, yayılmalarının azaltılması ve bitkilerde toksik etkiye sahip metallerin alınımını engellemesi nedeniyle tarım alanlarında iyileştirme amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Vasconcelos, 2014; Malerba ve Cerana, 2016).

Bu çalışmada insanlar için önemli bir besin ögesi olan domates yetiştiriciliğinde, mantar hastalıkları ile mücadele etmek için kullanılan ancak bitkilerde strese neden olan fungusitin olumsuz etkilerini azaltmak ve strese karşı bitki savunma refleksine katkı sağlamak için uygulanan kitosanın koruyucu rolü, antioksidan seviyeleri ve tek hücre jel elektroforezi ile incelenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Çalışma, sera koşullarında Mart-Temmuz 2022'de gerçekleştirildi. Denemede Kayra F1 (Anamas Tohum Company) çeşidi domates kullanıldı. Domates tohumlarının yüzey sterilizasyonlarının sağlanması amacıyla, 10 dakika süreyle %5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisinde yıkandı. Fideler, her biri 40 x 40 mm olan 128 gözlü viyollerde büyütüldü. Fide yetiştirme ortamı olarak torf (Klasman TS 1®) ve perlit (Agrobit®) (%60 torf, %40 perlit) karışımı kullanıldı. İstenilen büyüklüğe ulaşan fidanlar Mayıs ayında saksılara dikildi.

2.2. Fungisit ve Kitosan Uygulamaları

Bu çalışmada Adaga firmasından temin edilen %95 deasetilasyon derecesine sahip %2 Chitosan® kullanıldı. Fungisit stresi oluşturmak için Koruma Tarım firmasına ait %80 Mancozeb aktif madde içeren Dikotan M-45 ticari markalı fungusit kullanıldı. Fungisit çözeltisi 0, 400 ve 500 ppm dozlar halinde 3 farklı konsantrasyonda hazırlandı. Çözeltiler, fide dikiminden bir gün sonra ve iki hafta ara ile hasatta kadar toplam 3 kez olmak üzere yaprakların üst ve alt taraflarına püskürtüldü. Kitosan çözeltisi ise 0, 50, 100 ve 150 ppm dozlar

halinde 4 farklı konsantrasyonda hazırlandı ve ekimden bir gün önce ve daha sonra hasatta kadar her hafta düzenli olarak (bitki başına 15 ml) yaprakların üst ve alt taraflarına püskürtüldü. Uygulamalar tamamlandıktan sonra analiz çalışmaları için fidelerden yaprak örnekleri alındı ve -80°C de stoklandı. Kontrol gurubuna 0 ppm fungusit ve 0 ppm kitosan uygulandı. Domates fidelerinin uygulamalardan sonraki durumu Şekil 1.'de verilmiştir.



Şekil 1. Uygulama yapılan domates fideleri

2.3. Lipid peroksidasyonu (MDA) Tayini

Taze yapraklardaki lipid peroksidasyon seviyesi, %0.1 tiyobarbitürik asit kullanılarak malonaldehit (MDA) içeriği tahmin edilerek belirlendi (Zou vd., 2017). MDA içeriği $\mu\text{mol MDA g}^{-1}\text{FW}$ olarak ifade edildi.

2.4. Antioksidan Aktivite

Antioksidan enzimler (SOD ve CAT) aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Taze yaprak numuneleri (0.5 g) sıvı nitrojen içinde öğütüldü ve 5 ml soğuk potasyum fosfat tamponu (pH 7.8) içinde homojenize edildi. Daha sonra ekstraktlar $12.000 \times \text{g}^{-1}$ de 4°C 'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar daha fazla analiz için transfer edildi. SOD aktivitesi, nitrobluetetrazolium (NBT) testi kullanılarak Paoletti ve arkadaşları (1986) tarafından detaylandırılan yöntemle göre mavi formazan oluşumu 560 nm 'de absorbans değeri ölçüldü. Chance ve Maehly (1955) yöntemine göre substrat olarak guaiacol kullanılarak ölçüldü. CAT aktivitesi, 240 nm 'de H_2O_2 ($39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) için yok olma katsayısı kullanılarak belirlendi ve $\text{mg protein başına dakika başına düşen H}_2\text{O}_2$ olarak ifade edildi (Chance ve Maehly, 1955).

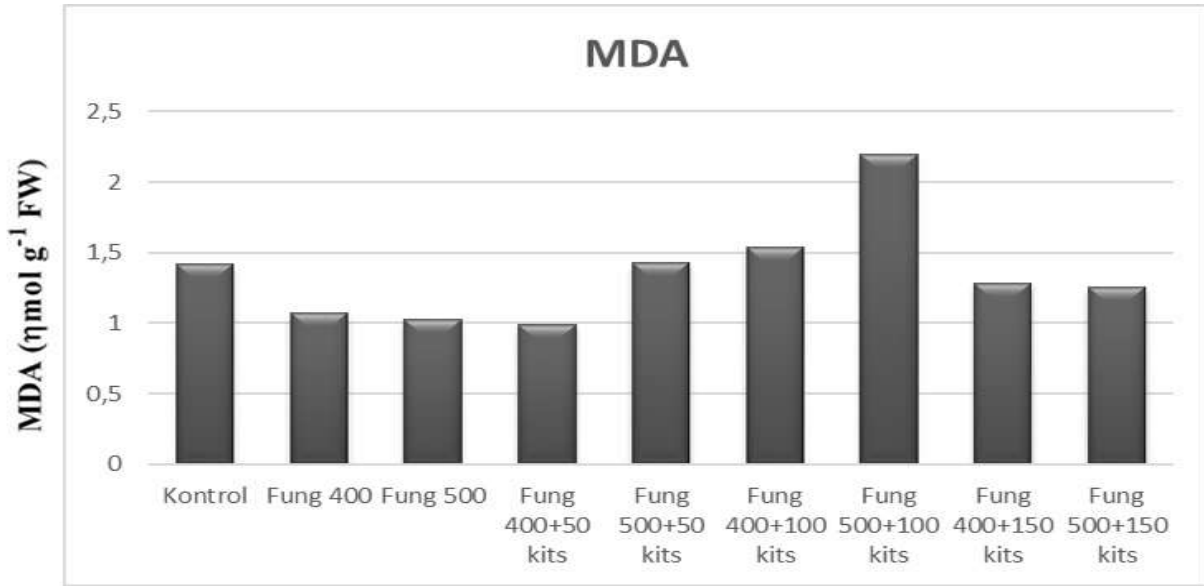
2.5. Tek Hücre Jel Elektroferez (Comet Assay) Analizi

Yaklaşık 75-150 mg bitki materyallerinden kesit alındı, kısaca GM (GM, 3.08 g/l Gamborg's B-5 Basal salt mixture (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 'de durulandı, bir kâğıt havluyla dikkatlice kurutulduktan sonra comet assay için kullanıldı. Mikroskopik slaytlar, %1 normal erime noktalı agaroz tabakasıyla önceden kaplandı ve 60°C 'de iyice kurutuldu. Kesit alınan parçalar, taze bir jilet ile buz üzerinde 50 mM EDTA içeren 300-400 μl PBS (160 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0) içinde parçalandı. Elde edilen çekirdek süspansiyonundan iki damla 30 μl ' lik her lam üzerine ayrı ayrı damlatıldı, aynı hacimde sıvı %1 düşük erime noktalı agaroz ile 42°C 'de karıştırıldı ve 22 mm x 22 mm'lik lamel bir örtü ile kaplandı. Çekirdekler daha sonra ya yüksek alkalide (0.3 M NaOH, 5 mM EDTA, pH 13.5) 10 dakika boyunca çözölmeye ya da yüksek tuzda (2.5 M NaCl_2 , 10 mM Tris 100 mM EDTA) parçalanmaya tabi tutuldu. Soğuk olarak 1 x TBE (90 mM Tris-borat, 2 mM EDTA, pH 8.4) tamponunda 3 x 5 dakika dengelemeyi, aynı tamponda 4 dakika veya 6 dakika boyunca oda sıcaklığında elektroferez takip etti (31 V (1 V/cm), 15-17 mA). Örnekler buz üzerinde soğutuldu 21 V (0.7 V/cm), 300 mA ile aynı çözeltide elektroferezden önce 5 dakika yüksek alkalide çözme yapıldı ve ardından 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 içinde 3 dakikalık kısa bir nötralizasyon yapıldı. Nükleer süspansiyonda bulunan nişasta taneciklerinin jellerini temizlemek için slaytlar %70 ve %96 etanol içinde 2 x

5 dakika dehidrasyondan önce %1 Triton içinde 10 dakika tutuldu ve havayla kurutuldu. Kuru agaroz jeller, 15 µl DuGreen (5 g/ml suda çözölmüş) ile boyandı, bir lam ile kaplandı ve hemen bir floresan mikroskobu ile değerlendirme için kullanıldı. Kodlanmış slaytlardan kuyruklu yıldızların görüntüleri, bilgisayar sistemine aktarıldı. Kuyruklu yıldız analizi, görüntü analiz yazılımı OpenComet modülü ile gerçekleştirildi. Her deney noktası, jel başına 35 ayrı kuyruklu yıldızın göç eden DNA yüzdesinin medyan değerlerine dayalı olarak dört kuyruklu yıldız jelinden ortalama değer (\pm standart sapma = S.D.) ile temsil edildi.

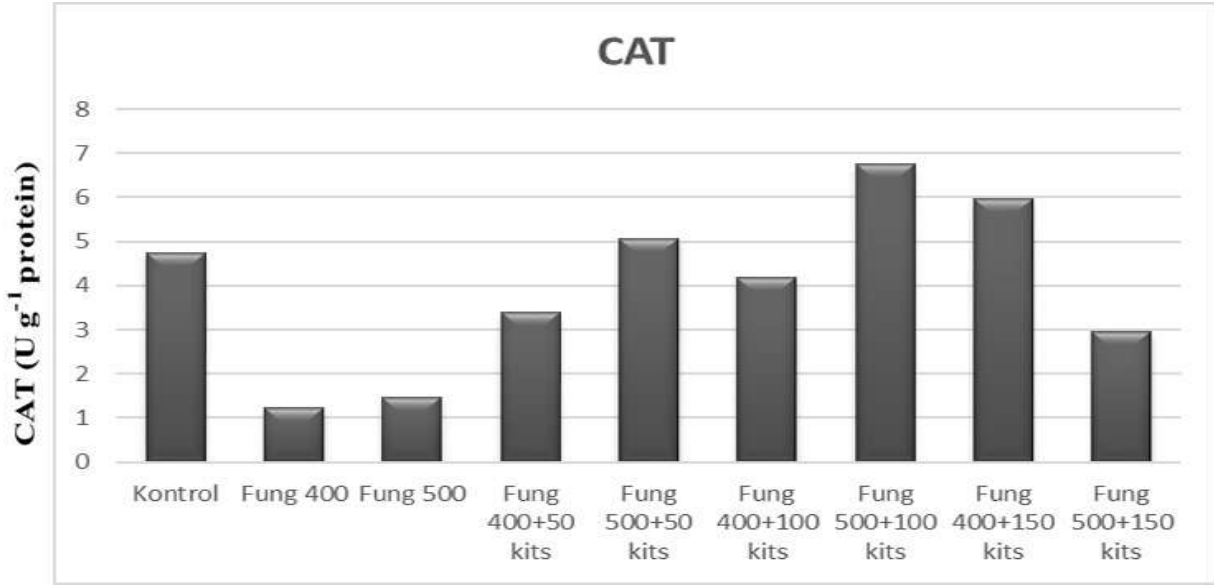
3. Bulgular

Fungisit stresi altındaki domates bitkilerine yapılan kitosan uygulamaları sonrasında bitkilerde antioksidan enzim oranları önemli ölçüde değişiklik gösterdiği belirlendi. Fungisit stresi, bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve melondialdehit (MDA) birikmesine neden olmaktadır. Bu maddelerin artması bitkilerin stresten etkilendiğinin ve zarar gördüğünün bir işaretidir. Çalışmamızda artan fungusit stresi ile MDA seviyesinin arttığı belirlendi. Kitosan uygulamaları sonrasında domates bitkilerinin MDA seviyelerinde azalma olduğu tespit edildi. 400 ve 500 mM fungusit stresi altında MDA birikimini azaltan en etkili kitosan uygulamasının 150 ppm'lik uygulamalar olduğu belirlendi (Şekil 2).



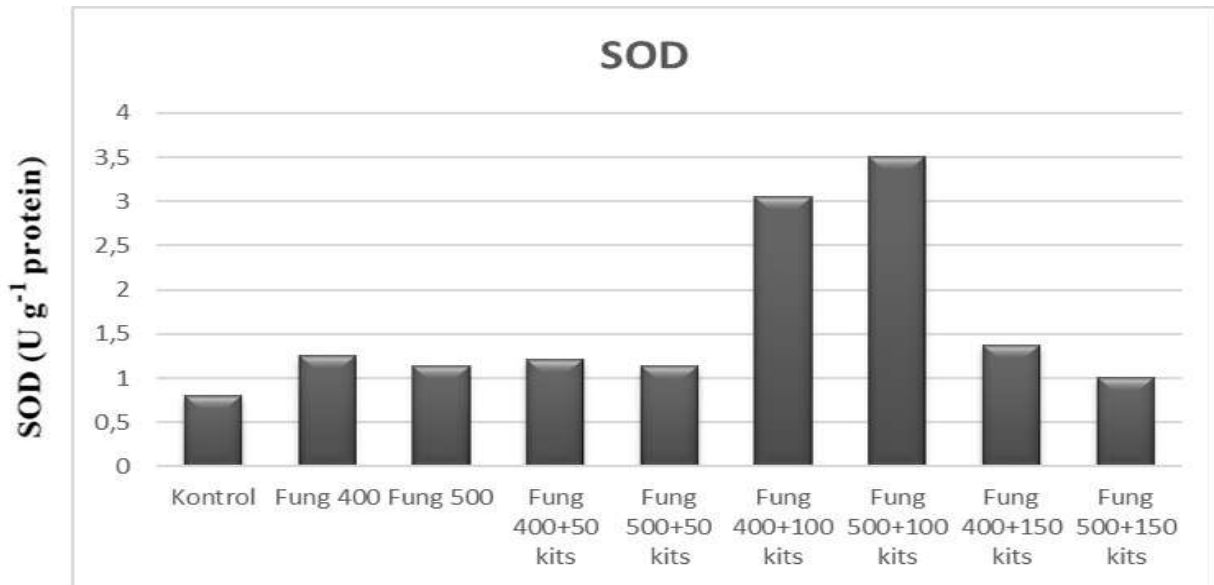
Şekil 2. Farklı fungusit ve kitosan uygulamalarının melondialdehit (MDA) seviyesine etkisi

Diğer antioksidan enzimler gibi, stres koşulları altında kitosan uygulamaları sonrasında domates fidelerinde CAT aktivitesinin arttığı tespit edildi. Her iki fungusit konsantrasyonunda da CAT enzim aktivitesini artırmak için en etkili kitosan uygulamasının 100 ppm'lik uygulama olduğu belirlendi (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı fungusit ve kitosan uygulamalarının katalaz (CAT) seviyesine etkisi

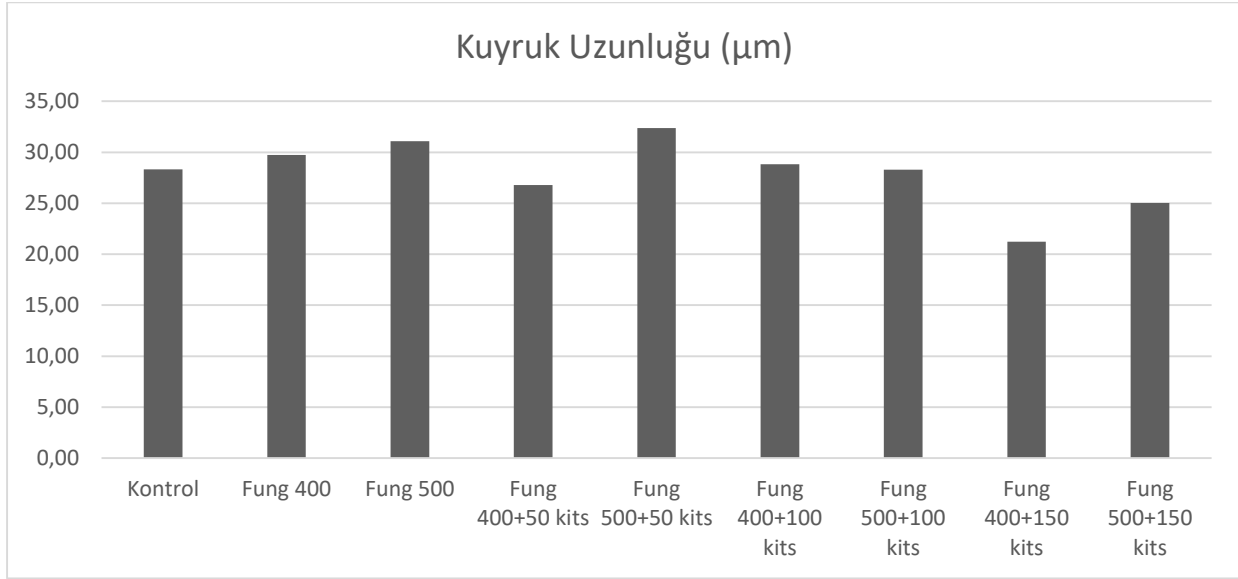
Fungisit stresi domates bitkilerinde SOD aktivitesini değiştirmektedir. Çalışmamızda fungusit stresine maruz kalan bitkilerin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerinde azalma meydana geldiği, kitosan uygulamaları sonrasında SOD enzim aktivitesinde genel olarak bir artış olduğu belirlendi. Her iki fungusit konsantrasyonunda da SOD enzim aktivitesini artırmak için en etkili kitosan uygulamasının 100 ppm'lik uygulama olduğu belirlendi (Şekil 4).



Şekil 4. Farklı fungusit ve kitosan uygulamalarının süperoksit dismutaz (SOD) seviyesine etkisi

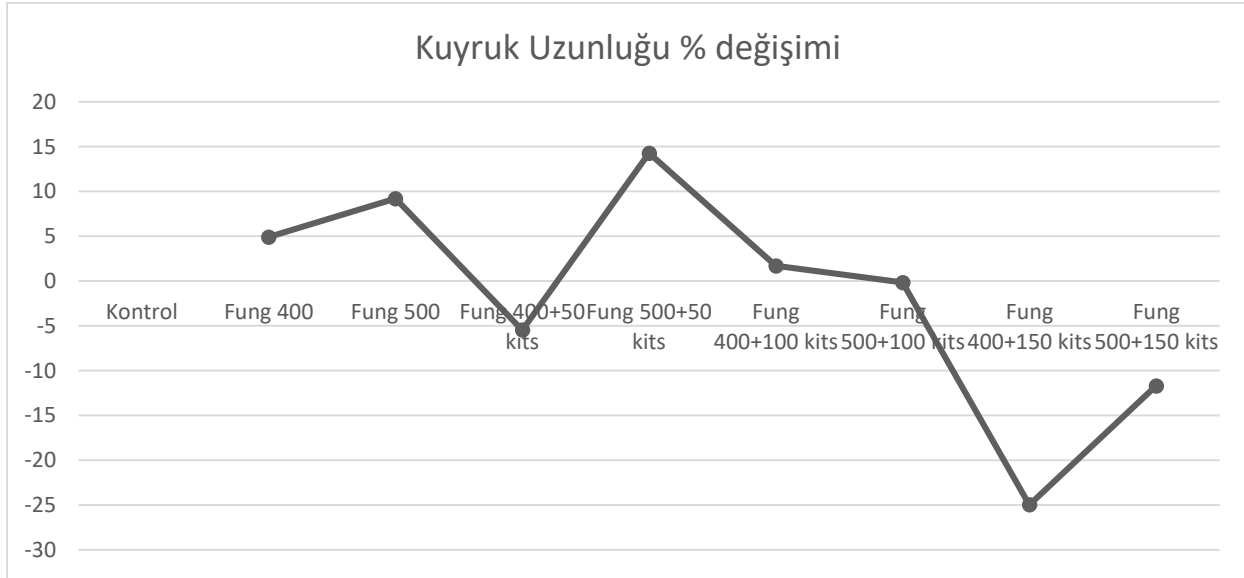
Fungisit uygulamasının domates fidelerinde DNA zincirinde meydana getirdiği tek ve çift iplik kırılma hasarı tek hücre jel elektroforezi yani kısaca comet assay analizi ile tespit edildi. Fungisit uygulandığı her iki dozda da (400 ppm ve 500 ppm) kuyruk uzunluğunun kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında doz miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı tespit edildi. En uzun kuyruk uzunluğu 500 ppm fungusit ve 500 ppm fungusit + 50 ppm kitosan uygulanan fidelerin ortalamasından elde edildi. 400 ppm fungusit + kitosan, 400 ppm + 150 kitosan ve 500 ppm + 150 ppm kitosan uygulanan örneklerin kuyruk uzunluklarının kontrol grubuna göre daha azaldığı görüldü. 400 ppm fungusit uygulanan fidelere takviye olarak verilen 50 ppm kitosan %9.9, 100 ppm kitosan %3.1 ve 150 ppm kitosan %28.6 kuyruk uzunluğunu azalttığı belirlendi. 500 ppm fungusit uygulamasında 100

ppm kitosan %8.9, 150 ppm uygulaması ise %19.5 kuyruk uzunluğunu azalttığı belirlendi. Ancak 50 ppm kitosan uygulaması kuyruk uzunluğunu %4.2 arttırdığı tespit edildi (Şekil 5).



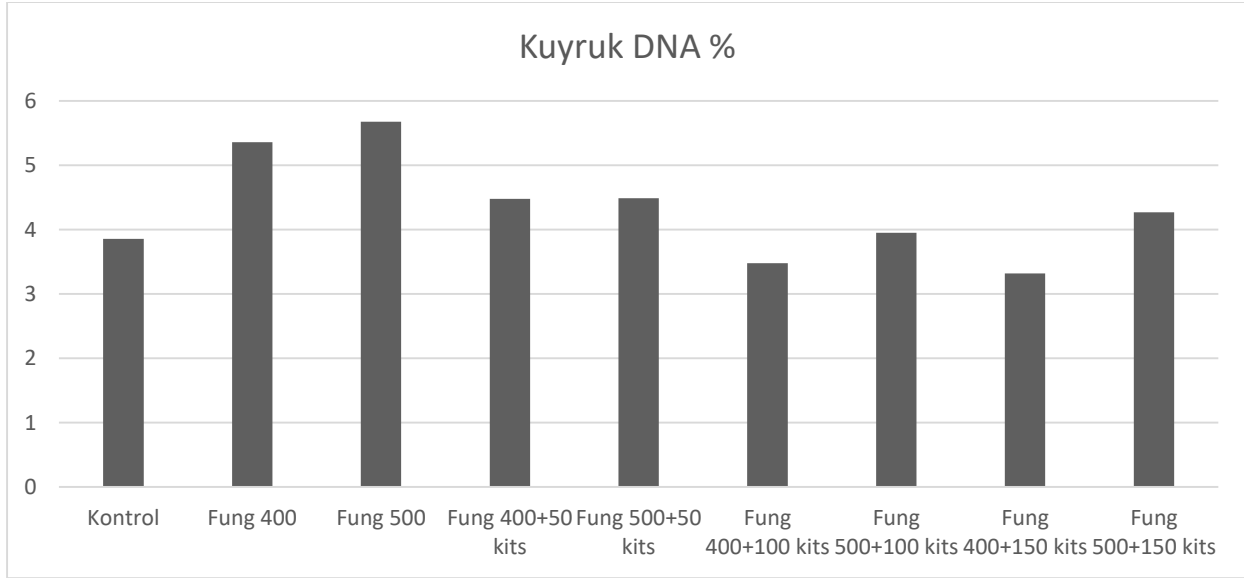
Şekil 5. Kontrol, fungusit ve fungusit+kitosan uygulanan örneklerin kuyruk uzunlukları

Kuyruk uzunluğundaki en çok azalma fungusit 400 ppm + 150 kitosan uygulamasından elde edildiği belirlendi (Şekil 6).



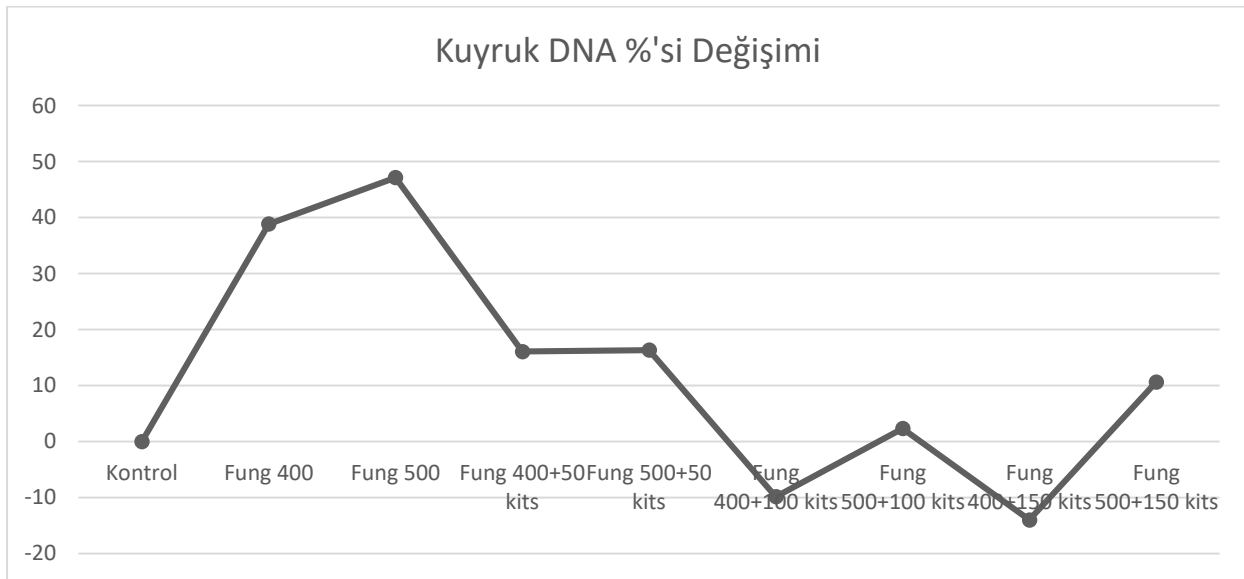
Şekil 6. Kontrol grubu ile uygulamalar arasında kuyruk uzunluğundaki yüzdelik değişim

Uygulama yapılan fidelerin kuyruk DNA yüzdesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fungusit uygulamasının fidelerin kuyruk DNA'larını etkilediği tespit edildi. Uygulanan fungusit dozuna bağlı olarak kuyruk DNA % değerinin arttığı belirlendi. Kuyruk DNA % değerinde fungusit 400 ppm uygulamasının %38.9 ve fungusit 500 ppm uygulamasının ise %47.6 artışa neden olduğu tespit edildi. Kuyruk DNA % değerinde en çok azalma ise 400 fungusit + 100 kitosanda %9.8 ve 400 fungusit + 150 kitosanda %14 olarak gerçekleşti (Şekil 7).



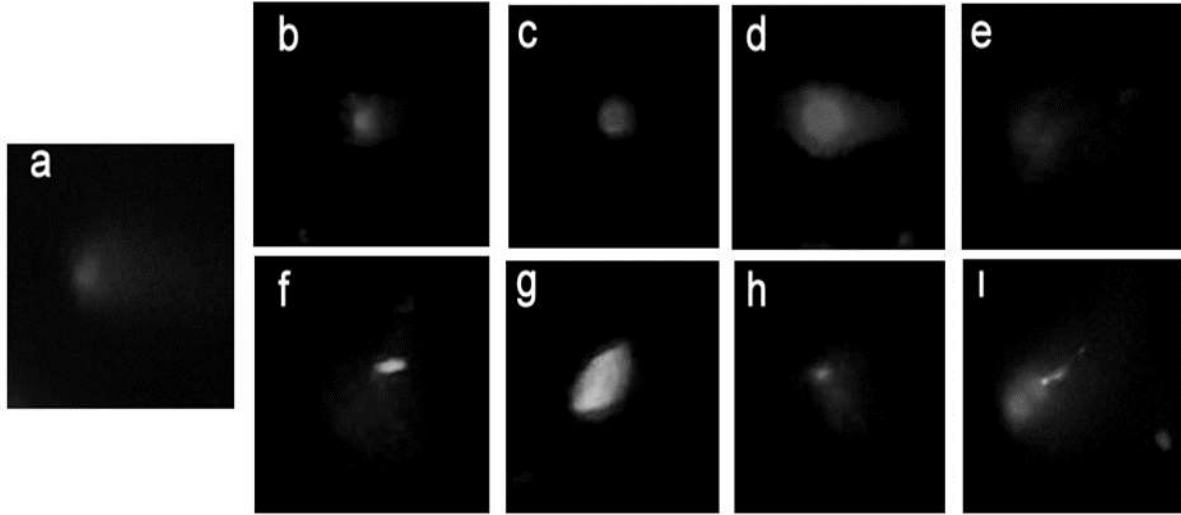
Şekil 7. Kontrol, fungusit ve fungusit + kitosan uygulanan domates fidelerinin kuyruk DNA% değerleri

Kontrol grubu ve uygulamalar sonucunda kuyruk DNA % değerlerinde meydana gelen değişim durumu verilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Kuyruk DNA % değerlerinde meydana gelen değişim

Kontrol, fungusit uygulanan ve fungusit + kitosan uygulanan domates fidelerinin DNA hasarının ölçütü olan comet assay görüntüleri verilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. a; kontrol gurubu, b; 400 ppm fungusit uygulaması, c; 500 ppm fungusit uygulaması, d; 400 ppm fungusit + 50 ppm kitosan uygulaması, e; 500 ppm fungusit + 50 ppm kitosan uygulaması, f; 400 ppm fungusit + 100 ppm kitosan uygulaması, g; 500 ppm fungusit + 100 ppm kitosan uygulaması, h; 400 ppm fungusit + 150 ppm kitosan uygulaması, i; 500 ppm fungusit + 150 ppm kitosan uygulaması

4. Tartışma

Günümüzde çevresel streslerin neden olduğu genotoksik etkilere verilen moleküler yanıtlara ilgi giderek artmaktadır. Son zamanlarda bitkilerin stresi tolere etmesi ve bitki savunma mekanizmalarını desteklemek için farklı organik maddeler kullanılmaktadır (Bulut, 2020). Bu organik maddelerden birisi de kitosandır. Kitosanın domates, pirinç ve kolza tohumunda JA (jasmonik asit) sinyal yolu aktivitesi ile bitki bağışıklığının aktive edildiği (Rakwal vd., 2002; Yin vd., 2011), tütün yapraklarında yapılan kitosanın sırasıyla kloroplast, nükleus, sitosol ve hücre membranında NO (nitrik oksit) oluşumunu indükleyerek bazı savunma ile ilgili enzimlerin aktivitelerini düzenleyebildiği (Zhang, vd., 2011) bildirilmiştir.

Çalışmamızda kitosanın fungusit stresine karşı domates fideleri üzerindeki etkisi enzim değerleri ve DNA fiziksel hasarı ile değerlendirilmiştir. Fungisit stresinin domates fidelerinin DNA'larında meydana getirdiği fiziksel hasarın boyutu Tek hücreli jel elektroforezi (Comet assay) ile değerlendirilmiştir. Bu teknik stres altındaki bitki hücrelerinin karakterize edilmesi ve DNA onarımının analizinde kullanılabilir olduğu önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (Hartung vd., 2002; Heitzberg vd., 2004; Kozak vd., 2009; Waterworth vd., 2009; Bohmdorfer vd., 2011; Kamisugi vd., 2012; Donà vd., 2013). Abiyotik streslerin etkisiyle üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) DNA çift sarmal kopmaları (DSB'ler), tek sarmal kopmaları (SSB'ler) ve taban hasarına neden olmaktadır (Jeggo, 2010). Tek hücreli jel elektroforezi DNA'nın hareketsiz nükleer DNA'dan göçünü ölçerek DNA zincir kırıklarını ve alkali kararsız bölgeleri saptayabilmektedir (Singh vd., 1988). DNA'nın yapısında meydana gelen tek ve çift iplik kopmaları kuyruk uzunluğu ve kuyruk DNA % değerinde artışa neden olmaktadır.

Çalışmamızın comet analizi sonuçları kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında fungusit stresinin uygulanan örneklerde kuyruk uzunluğu ve kuyruk DNA % değerinde artışa neden olduğunu göstermektedir. Fungisit dozu ile kuyruk uzunluğu ve kuyruk DNA % değerinin doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Fungisit uygulamasının DNA tek ve çift iplik kırılmalarına neden olduğu comet analizi ile belirlenmiştir. Bitkilerin reaktif oksijen türlerine karşı ortaya koydukları savunma refleksi antioksidanların seviyelerindeki değişim değerlendirilebilir. Bu çalışmada da SOD, CAT ve MDA enzimlerin ekspresyon değerlerinin fungusit stresine bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Özellikle fungusit uygulamasının dozuna bağlı olarak CAT enzim ekspresyonlarının baskılandığı belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda herhangi bir abiyotik stres koşulunda ROS'un detoksifikasyonunda hayati bir rol oynadığı belirtilen (Garg ve Manchanda, 2009) CAT ifade düzeyinin kontrol gurubu örneklerin enzim değeri karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir. SOD enzim ekspresyonunun kontrol gurubuna göre fungusit uygulamalarında artışa neden olduğu, CAT enzimine göre daha öncelikli ve korunaklı ifade edildiği tespit edilmiştir. Literatürde de benzer şekilde SOD'un farklı çevresel

streslerde ROS müdahaleli oksidatif strese duyarlı olan çok etkili bir hücre içi enzimatik antioksidan olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Zhang vd., 2020). MDA değerlerinin de fungusit uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir. Enzim değerlerindeki değişim domatesteki fungusit stresini ve domatesin bu strese yanıt verme durumunu göstermiştir.

Fungisit stresine karşı bitki savunma mekanizmalarını desteklemek amacıyla uygulanan kitosanın özellikle 100 ppm ve 150 ppm uygulamalarının DNA hasarını azalttığı kuyruk uzunluğunda ve kuyruk DNA % değerinde meydana gelen azalma ile belirlenmiştir. Fungisit uygulanan fideler ile kontrol gurubu fidelerle karşılaştırıldığında 150 ppm kitosan uygulamasının kuyruk uzunluğunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bu durum kuyruk DNA % değerinde de benzer olarak ölçülmüştür. Ancak 50 ppm kitosan uygulamasının fungusit stresinde bariz bir olumlu etkisinin olmadığı, hatta 500 ppm fungusit uygulamasında kuyruk uzunluğunu yani DNA hasarını arttırdığı görülmüştür.

Kitosan uygulamasının SOD değerini özellikle 100 ppm ve 150 ppm uygulamasında arttırdığı belirlenmiştir. 400 ppm fungusit uygulamasında ilave edilen 100 ppm kitosanın SOD değerinde önemli bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. CAT enzim miktarının ekspresyonunda özellikle 500 ppm fungusit + 100 ppm kitosan ve 400 ppm fungusit + 150 kitosan uygulanan örneklerde önemli derecede artış olduğu belirlenmiştir. MDA değerlerinin 100 ppm ve 150 ppm kitosan uygulamasıyla artış görülmüştür.

Kitosan ve kitosan türevlerinin bitkinin; bakterilere (Tikhonov vd., 2006; Rabea ve Steurbaut, 2010) ve mantarlara (Trotel-Aziz vd., 2006) karşı savunmasını artırmak için kullanılabileceğini önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Kitosanın yer fıstığında pas hastalığına ve portakallarda *Penicillium digitatum*'a karşı kitosanın antifungal özellikteki hidrolazları artırarak dayanıklılık sağladığı (Sathiyabana ve Balasubramanian, 1998), domateste *R. solanacearum*'a karşı farklı konsantrasyonlardaki kitosanın bitki büyümesini desteklediği ve aktif savunma reaksiyonlarını indüklediği (Narasimhamurthy vd., 2022), tütün yapraklarına uygulanan kitosan antioksidan enzim aktivitesinde artışlara neden olduğu (Falcon-Rodriguez vd., 2011), üzüm bağlarına uygulanan kitosanın depolanmış üzümlerde endokitinaz aktivitesini artırdığı ve reaktif oksijen türlerinden hidrojen peroksit içeriğini azalttığı (Feliziani vd., 2013) bildirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, bitki yetiştiriciliğinde hastalık ve streslere karşı kitosanın kullanılabileceği konusunda önceki çalışmaları desteklemektedir.

5. Sonuçlar

Çalışma verileri, fungusit uygulamasının domateste strese neden olduğunu desteklemektedir. Fungisit stresi ile ortaya çıkan enzim değerlerine kitosanın olumlu yönde etki ettiği belirlenmiştir. Kitosan uygulamasının DNA tek ve çift kırılmaları sonucu ortaya çıkan DNA hasarını azalttığı tek hücre jel elektroforez analizi ile belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarımız bitkiler üzerinde fungusit stresinin azaltılması için özellikle 100 ppm ve 150 ppm kitosan uygulamasının yapılabileceğini ortaya koymuştur.

Bundan sonraki çalışmalarda özellikle stres faktörleri ve bunlara karşı olası koruyucu rolü incelenen etkenlerin DNA transkripsiyonunun sonucu olan protein içeriğinin incelenmesi uygulamaların sonuçlarının tespiti için önem arz etmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından FBA-2021-765 kodlu desteklenen projeden elde edilmiştir. Yazarlar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederler.

Yazar Katkıları

Hüseyin Bulut: Çalışmayı planlamış ve tasarlamıştır. Çalışmanın verilerini değerlendirmiş ve makaleyi yazmıştır.

Halil İbrahim Öztürk: Çalışmanın uygulamalarını yapmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

- Belpoggi, F., Soffritti, M., Guarino, M., Lambertini, L., Cevolani, D., Maltoni, C. (2010). Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats, *Ann N Y Acad Sci.* 982:123–136, DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04928.x
- Bohmdorfer, G., Schleiffer, A., Brunmeir, R., Ferscha, S., Nizhynska, V., Kozak, J., Angelis, K.J., Kreil, D.P., Schweizer, D. (2011). GMI1, a structural-maintenance-of-chromosomes-hinge domain-containing protein, is involved in somatic homologous recombination in Arabidopsis, *Plant Journal*, 67, pp. 420-433, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04604.x
- Bulut, H. (2020), Mısır (*Zea mays* L.)’ da Tuz Stresine Karşı Humik Asidin Etkisi, *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, Vol. 10-1, 11 – 18.
- Camargo Carniel, L.S., Niemeyer, J.C., Iuñes de Oliveira Filho, L.C., Alexandre, D., Gebler, L., Klauberg-Filho, O. (2019). The fungicide mancozeb affects soil invertebrates in two subtropical Brazilian soils, *Chemosphere*, 232, pp. 180-185, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.179>
- Chance, B., Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764–775.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.*, 26, pp. 249-261, DOI: 10.1385/MB:26:3:249
- Costa-Silva, D.Gd et al. (2018). N -acetylcysteine inhibits Mancozeb-induced impairments to the normal development of zebrafish embryos, *J. Neurotoxicol. Teratol.*, 68, 1-12, <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.04.003>
- Donà, M., Confalonieri, M., Minio, A., Biggiogera, M., Buttafava A., Raimondi, E., Delledonne M., Ventura, L., Sabatini, M.E., Macovei, A., Giraffa, G., Carbonera, D., Balestrazzi, A. (2013). RNA-Seq analysis discloses early senescence and nucleolar dysfunction triggered by Tdp1 α depletion in *Medicago truncatula*, *J. Exp. Bot.* <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert063>.
- Falcon-Rodriguez AB, Costales D, Cabrera JC, Martinez-Tellez MA (2011) Chitosan physico-chemical properties modulate and resistance in tobacco plants against the oomycete *Phytophthora nicotianae*. *Pestic. Biochem. Phys.* 100: 221-228.
- Feliziani E, Smilanick JL, Morgosan DA, Mansour MF, Gu S, Gohil HL, Ames ZR (2013) Preharvest fungicide potassium sorbat or chitosan use on quality and storage decay of table grapes. *Plant Dis.* 97: 307-314.
- Hartung, F., Angelis, K.J., Meister, A., Schubert, I., Melzer, M., Puchta H. (2002). An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants, *Curr. Biol.*, 12, pp. 1787-1791, DOI: 10.1016/s0960-9822(02)01218-6
- Heitzberg, F., Chen, I.-P., Hartung, F., Orel, N., Angelis, K.J., Puchta, H. (2004). The Rad17 homologue of Arabidopsis is involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination, *Plant J.*, 38, pp. 954-968, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02097.x
- Jeggo, P.A. (2010). A break is not the End; insight into the damage response to DNA double strand breaks, *DNA Repair*, 9, pp. 1217-1218, DOI: 10.1016/j.dnarep.2010.09.021
- Jennifer, R., Joan, F., Jeannie, E., Da L. (2017). A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard, *J. Environ. Int.*, 99, DOI: 10.1016/j.envint.2016.11.006
- Kamisugi, Y., Schaefer, D.G., Kozak, J., Charlot, F., Vrielynck, N., Hola, M., Angelis, K.J., Cuming, A.C., Nogue, F. (2012). MRE11 and RAD50, but not NBS1 are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*, *Nucleic Acids Res.*, 40 pp. 3496-3510, doi: 10.1093/nar/gkr1272
- Kaushik G., Satya S., Naik S.N. (2009). Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review, *Food Research International* 42(1):26-40, DOI: 10.1016/j.foodres.2008.09.009
- Kleinkauf, N., Verweij, P.E., Arendrup, M.C., Donnelly, P.J., Cuenca-Estrella, M., Fraaije, B., et al. (2013). Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report, ECDC, Stockholm, DOI: 10.2900/76274
- Kontou, S., Tsipi, D., Tzia, C. (2004). Stability of the dithiocarbamate pesticide maneb in tomato homogenates

- during cold storage and thermal processing, *J. Food Addit. Contam.: Part A*, 21, <https://doi.org/10.1080/02652030400019372>
- Kozak, J., West, C.E., White, C., Costa-Nunes, J.A. da, Angelis, K.J. (2009). Rapid repair of DNA double strand breaks in Arabidopsis is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance, *DNA Repair*, 8, pp. 413-419, DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.11.012
- Lenucci, M. S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G., Dalessandro, G. (2006). Antioxidant Composition in Cherry and High-Pigment Tomato Cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7, 2606–2613, <https://doi.org/10.1021/jf052920c>
- Malerba, M., Cerana, R. (2016). Chitosan effects on plant systems, *International journal of molecular sciences*, 17(7), 996, DOI: 10.3390/ijms17070996
- Narasimhamurthy, K., Udayashankar, A. C., Britto, S.D., et al. (2022). Chitosan and chitosan-derived nanoparticles modulate enhanced immune response in tomato against bacterial wilt disease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 220, 223-237. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.054
- Ong, K. (2011). Basic plant pathology training pathogenic agents. *Agi Life Extension Texas*, pp 1.
- Ostling, O., Johansons, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells, *BBRC*, 123, pp. 291-298, DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A. et al.(1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts, *Anal. Biochem.* 154, 536–541, DOI: 10.1016/0003-2697(86)90026-6
- Rakwal, R., Tamogami, S., Agrawal, G. K., & Iwahashi, H. (2002). Octadecanoid signaling component “burst” in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(5), 1041-1045, DOI: 10.1016/s0006-291x(02)00779-9
- Sathiyabana M, Balasubramanian R (1998) Chitosan induces resistance components in Arachis hypogaea against leaf rust caused by Puccinia arachidis, *Speg. Crop Prot.* 17: 307-313.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, 175, pp. 184-191, DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Stephenson, O.J., Trombetta L.D. (2020). Comparative effects of Mancozeb and Disulfiram-induced striated muscle myopathies in Long-Evans rats, *Environ. Toxicol. Pharm.*, 74, Article 103300, DOI:10.1016/j.etap.2019.103300
- Sugeng, A.J., Beamer, P.I., Lutz, E.A., Rosales, C.B. (2013). Hazard-ranking of agricultural pesticides for chronic health effects in Yuma County, Arizona, *J. Sci. Total Environ.*, pp. 463-464, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.05.051
- Tarimorman(2022)https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Bitki_Koruma_Urunleri/Istatistik/Yillar_Itibariyla_BKU_Kullanim_Miktar_2006-2021.pdf
- Tikhonov, V. E., Stepnova, E. A., Babak, V. G., Yamskov, I. A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., et al. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl- derivatives, *Carbohydr. Polym.* 64, 66–72. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.10.021
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., and Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of Botrytis cinerea, *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 405–413. doi: 10.1007/s10658-006-0005-5
- TÜİK (2022) <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-2.Tahmini-2022-45503>
- Vasconcelos, M. W. (2014). Chitosan and chitooligosaccharide utilization in phytoremediation and biofortification programs: current knowledge and future perspectives, *Frontiers in plant science*, 5, <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00616>
- Waterworth, W.M., Kozak, J., Provost, C.M., Bray, C.M., Angelis, K.J., West, C.E. (2009). DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks, *BMC Plant Biol.*, 9, p. 79, DOI: 10.1186/1471-2229-9-79
- Wise, K. A., Smith, D., Freije, A. S., Mueller, D., Kandel, Y., Allen, T., Bradley, C. A., et al. (2019). Meta-analysis of yield response of foliar fungicide-treated hybrid corn in the United States and Ontario, Canada, *Plosone*, Published: June 5, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217510>

- Yang, M., Xi, X., Wu, X., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H. (2015). Vortex-assisted magnetic β -cyclodextrin/attapulgitite-linked ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the fast determination of four fungicides in water samples, *Journal of Chromatography A*, Volume 1381, 13 Pages 37-47, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.016>
- Yin, H., Li, Y., Zhang, H. Y., Wang, W. X., Lu, H., Grevsen, K., ... & Du, Y. (2013). Chitosan oligosaccharides–triggered innate immunity contributes to oilseed rape resistance against *Sclerotinia Sclerotiorum*, *International Journal of Plant Sciences*, 174(4), 722-732, <https://doi.org/10.1086/669721>
- Zhang, C., Yi, X., Gao, X., Wang, M., Shao, C., Lv, Z., Chen, J., Liu, Z., Shen, C. (2020). Physiological and biochemical responses of tea seedlings (*Camellia sinensis*) to simulated acid rain conditions, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*192, 110315, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110315>
- Zhang, H., Zhao, X., Yang, J., Yin, H., Wang, W., Lu, H., & Du, Y. (2011). Nitric oxide production and its functional link with OIPK in tobacco defense response elicited by chitooligosaccharide, *Plant cell reports*, 30(6), 1153-1162, DOI: 10.1007/s00299-011-1024-z
- Zou, P., Tian, X., Dong, B., Zhang, C. (2017). Size effects of chitooligomers with certain degrees of polymerization on the chilling tolerance of wheat seedlings, *Carbohydr. Polym.* 160, 194–202, DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.12.058